

# **Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Strukturprotein Filamin und der Proteinkinase C $\alpha$**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von  
Ulrich Tigges  
aus Gütersloh

1. Referentin: Prof. Dr. B.M. Jockusch

2. Referent: Prof. Dr. H. Hinssen

eingereicht am: 02.Oktober 2003

mündliche Prüfung (Disputation) am: 17. Dezember 2003

(2003)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VI</b>
<b>I Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1 Filamin (FLN) .....	1
1.1 FLN: Aufbau und Isoformen .....	1
1.2 FLN: Aktin-Bindung .....	4
1.3 FLN-Interaktionen .....	5
1.4 FLN: Regulation der Funktionen .....	8
2 PKC .....	10
2.1 Die PKC-Isotypen .....	10
2.2 PKC: Regulation der Funktion und Bindungspartner .....	13
2.3 PKC und das Zytoskelett .....	18
3 Ziele der Arbeit .....	19
<b>II Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
1 Material .....	20
1.1 Chemikalien und Enzyme .....	20
1.2 Bakterien .....	20
1.3 Hefen .....	21
1.4 Tierische Zellkulturzellen .....	22
1.5 Vektoren .....	22
1.6 Oligodesoxynukleotide .....	22
1.7 Antikörper .....	25
1.8 Tierische Organe und Gewebe .....	26
1.9 Geräte .....	26
2 Methoden .....	27
2.1 Molekularbiologische Methoden .....	27
2.1.1 Anzucht von E. coli .....	27
2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien .....	27
2.1.2 Transformation von Bakterien .....	28
2.1.3 Plasmidpräparation .....	28
2.1.3.1 TELT-Methode .....	28
2.1.3.2 Alkalische Lyse-Methode .....	28
2.1.3.3 Plasmidpräparation mit Qiagen Plasmid Kits .....	29
2.1.4 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	29
2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	30
2.1.6 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen .....	30
2.1.7 Alkohol-Präzipitation von DNA .....	30
2.1.8 DNA-Fragment-Isolierung .....	31
2.1.9 In vitro -Neukombination von DNA-Fragmenten .....	31
2.1.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	31
2.1.11 Klonierung von PCR-Produkten .....	32
2.1.12 Ortsspezifische Mutagenese .....	32
2.1.13 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung .....	32
2.1.14 Yeast-two-hybrid-System .....	33
2.1.14.1 Herstellung kompetenter Saccharomyces cerevisiae-Zellen .....	33
2.1.14.2 Transformation von S. cerevisiae .....	34
2.1.14.3 $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay .....	34
2.2 Biochemische Methoden .....	35

2.2.1 Präparation von Putenmagen-Filamin .....	35
2.2.2 Expression in E. coli und Zellschnellaufschluss.....	36
2.2.3 Expression und Reinigung von rekombinanten human FLNa, FLNb und FLNc Fragmenten mit His-Tag.....	36
2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	37
2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford .....	37
2.2.4.2 Proteinbestimmung über molare Extinktionskoeffizienten .....	37
2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.2.6 Immunblot.....	39
2.2.7 In vitro Transkription und Translation zur radioaktiven Markierung von Polypeptiden .....	39
2.2.8 Dot overlay Assay.....	40
2.2.9 Phosphorylierung von FLN durch die Proteinkinase C $\alpha$ (PKC $\alpha$ ) .....	40
2.2.10 Phosphorylierung mittels der cAMP-abhängigen Serin/Threonin Proteinkinase (PKA).....	41
2.2.11 Saccharose-Lipidvesikel (SLV) Pulldown .....	41
2.2.12 Kinase Assay/ Saccharose-Lipidvesikel (SLV) Pulldown .....	42
2.2.13 Kinase/Dimerisierungs Assay.....	42
2.3 Zellbiologische Methoden .....	43
2.3.1 Kultivierung von Zellkulturzellen .....	43
2.3.2 Passagieren von Zellen .....	43
2.3.3 Kryokonservierung von Zellen .....	44
2.3.4 Transiente Transfektion von Zellen.....	44
2.3.4.1 Calciumphosphat-Methode.....	44
2.3.4.2 Transfektion mit FuGene <sup>TM</sup> Transfektionsreagenz .....	44
2.3.5 Ko-Immunpräzipitation .....	45
2.3.6 Nachweis von in vivo Phosphorylierung durch Markierung mit [ <sup>32</sup> P]Orthophosphat und Immunpräzipitation .....	46
<b>III Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
1 Filamin (FLN) ist ein PKC $\alpha$ -Interaktionspartner im Yeast-two-hybrid-System .....	48
1.1 Generierung einer ATP-bindungsdefizienten PKC $\alpha$ -Mutante-(K368M) und Klonierung der mutierten Sequenz in einen Hefe-Expressionsvektor für das Yeast- two-hybrid-System .....	49
1.2 Das PKC $\alpha$ -(K368M)-Yeast-two-hybrid-Fusionsprotein interagiert mit einem bekannten PKC $\alpha$ -Liganden, aber nicht mit einem weiteren Kontrollprotein .....	50
1.3 Identifizierung, Isolierung und Bestätigung positiver Klone bei der Suche nach PKC $\alpha$ -Liganden im Yeast-two-hybrid-System .....	51
1.4 Die cDNA-Sequenz der positiven Klone.....	53
2 Die im Yeast-two-hybrid identifizierten FLN-Fragmente und PKC $\alpha$ lassen sich nach In-situ-Quervernetzung aus HeLa-Zellen ko-Immunpräzipitieren.....	55
3 FLN und PKC $\alpha$ binden in Dot-overlay-Versuchen Ko-Faktor abhängig .....	58
3.1 Präparation von FLN aus Putenmagen .....	58
3.2 Putenmagen-FLN bindet im Dot-overlay an PKC $\alpha$ .....	60
3.3 In-vitro-translatiertes und [ <sup>35</sup> S]Methionin-markiertes FLNa interagiert mit rekombinanter PKC $\alpha$ .....	61
3.4 Die FLN-PKC $\alpha$ -Interaktion ist Ko-Faktor abhängig .....	63
3.5 Die Ko-Faktor-abhängige FLN-PKC $\alpha$ -Interaktion lässt sich auch mit rekombinanten FLNa-Fragmenten bestätigen .....	64
3.6 Eingrenzung der FLNa-Regionen, die an PKC $\alpha$ binden .....	67
3.7 Eingrenzung der PKC $\alpha$ -Bindungsregion für FLNa.....	70

3.8 Untersuchung der FLN-Phosphorylierung durch PKC $\alpha$ .....	72
3.8.1 <i>In-vivo</i> -Phosphorylierung von FLNa .....	72
3.8.2 Die FLN Phosphorylierung durch PKC $\alpha$ ist PIP2 unabhängig .....	75
3.8.3 Sowohl N- als auch C-terminale FLNa-Deletionsfragmente lassen sich durch PKC $\alpha$ phosphorylieren .....	76
3.8.4 C-terminale Fragmente von FLNa und FLNc lassen sich mit PKC $\alpha$ in vitro phosphorylieren, FLNb nicht .....	78
3.8.5 Einfluss der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung auf die Dimerisierung von FLN .....	79
3.8.6 Einfluss der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung auf die Lipidbindung von FLN .....	81
<b>IV Diskussion .....</b>	<b>84</b>
1 Filamin bindet im Yeast-two-hybrid-System an PKC $\alpha$ . Die Interaktion lässt sich mit weiteren In-vitro- und In-vivo-Systemen bestätigen .....	84
2 PKC $\alpha$ -interagiert mit FLNa und FLNc .....	87
3 PKC $\alpha$ bindet FLNa in der Nähe funktionell wichtiger Domänen .....	89
4 Die PK $\alpha$ -FLNa-Interaktion ist Ko-Faktorabhängig .....	91
5 FLNa wird durch PKC $\square$ in vivo phosphoryliert und erfüllt die Kriterien eines STICK- Interaktionspartners .....	93
6 Die FLNa-Phosphorylierung durch PKC $\alpha$ hat keinen Einfluss auf die Dimerisierung oder die Lipidbindung des FLNa-C-Terminus .....	94
7 Überlegungen zur Bedeutung der PKC $\alpha$ -FLNa-Interaktion .....	95
8. Ausblick .....	100
<b>V Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>

**Abkürzungen**

Å	Angström ( $10 \text{ Å} = 1 \text{ nm}$ )
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	engl. Basenpaare
BSA	engl. Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cDNA	copy-Desoxyribonucleinsäure
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
DSP	Dithiobis(succinimidyl propionate)
DSS	Disuccinimidyl suberate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraessigsäure
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	engl. Fötales Kälberserum
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G-Aktin	globuläres Aktin
H	engl. Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N'-[Ethanschwefelsäure]
HMW	high molecular weight marker
HRP	engl. Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
kd	Kinaseuntereinheit
L, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Broth
LMWM	low molecular weight marker
M, mM, µM, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
mA	Milliampere
min	Minuten
mol, mmol, µmol, nmol, pmol	Mol, Millimol, Mikromol, Nanomol, Pikomol
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	engl. Molekulargewicht
Ni	Nickel
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PC	Phosphatidylcholin
PCR	engl. Polymerase-Kettenreaktion

PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	engl. Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sek	Sekunden
SDS	engl. Natrium-Dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	engl. Enzymeinheit
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

## Zusammenfassung

Filamin (FLN) ist eine Komponente von Zell-Matrix-Kontakten. Die FLN-Homodimere sind an der Quervernetzung und Membranverankerung von filamentösem Aktin beteiligt. Des Weiteren sind für die drei in Vertebraten vorkommenden Isoformen (FLNa, FLNb und FLNc) bis heute über 20 Protein-Liganden beschrieben. Die Interaktionen von Filamin mit verschiedenen Membranrezeptoren und Signalmolekülen macht eine Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen sehr wahrscheinlich. Die Proteinkinase C (PKC) ist eine Serin/Threonin-Kinase, deren Einfluss auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts in diversen Arbeiten demonstriert werden konnte. Eine Wechselwirkung von PKC $\alpha$  mit Filamin wurde bereits verschiedentlich postuliert, eine detaillierte Untersuchung der Interaktion ist hingegen zuvor noch nicht vorgenommen worden. Zu Beginn der im Folgenden beschriebenen Arbeit sind Yeast-two-hybrid-Analysen mit PKC $\alpha$  als Köderprotein durchgeführt worden. Filamin konnte dabei als direkter Bindungspartner für PKC $\alpha$  identifiziert werden. Die Interaktion ließ sich durch Ko-Immunpräzipitationsversuche bestätigen. Mit Hilfe von FilaminA-(FLNa)-Deletionsfragmenten konnten mittels biochemischer Bindungsstudien zwei Interaktions-regionen eingegrenzt werden, welche in unmittelbarer Nähe der Aktinbindungs- und Dimerisierungsdomänen liegen. Auf Seiten der PKC $\alpha$  wurde die regulatorische Untereinheit als interaktionsvermittelnd identifiziert. Die Bindung zwischen PKC $\alpha$  und FLNa erwies sich als Calcium- und Phospholipid-abhängig. Für die In-vitro-Phosphorylierung von FLN konnten isoformspezifische Unterschiede festgestellt werden: Die C-Termini von FLNa und FLNc ließen sich durch PKC $\alpha$  phosphorylieren, der C-Terminus von FLNb dagegen nicht. In HeLa-Zellen war es möglich, eine In-vivo-Phosphorylierung von Filamin durch PKC zu demonstrieren. Experimentell ließ sich bisher kein Einfluss der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung auf Funktionen wie die FLN-Dimerisierung und -Lipidbindung ermitteln. Die physiologische Relevanz der Interaktion könnte somit darin bestehen, PKC $\alpha$  in die Nähe weiterer Substratproteine zu lokalisieren. Dass PKC $\alpha$  auch C-terminal an FLNa bindet, also genau dort, wo die meisten der FLN-Interaktionen stattfinden, unterstützt diese Vermutung. Die Phosphorylierung von FLNa durch PKC könnte ferner die Bindungseigenschaften von FLN für Proteine des Zytoskeletts modulieren. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, dass die FLNa-PKC-Interaktion die mechanische Stabilität von Zellen beeinflussen kann. In diesem Kontext könnte sowohl eine spezifische Lokalisation von PKC als auch eine Modulation der FLN-Bindungseigenschaften von Bedeutung sein.

# **I Einleitung**

## **1 Filamin (FLN)**

Filamin wurde zuerst 1975 als zufälliges Nebenprodukt aufgereinigt, als Thomas Stossel und John Hartwig versuchten, Calcium-sensitives Myosin aus Makrophagen zu isolieren (Hartwig und Stossel, 1975). Zunächst war das neue Protein ‚actin-binding protein‘ (ABP) genannt worden. Es zeigte sich dann, dass mit geringen Mengen des neu entdeckten Proteins große Mengen aufgereinigtes Muskel-Aktin präzipitiert werden konnten (Stossel und Hartwig, 1975). Mit Antikörpern, die gegen das neue Protein gewonnen wurden, ließ sich demonstrieren, dass Filamin in Hühner-Fibroblasten entlang der Aktin-reichen Stressfasern zu finden ist (Shizuta et al., 1976; Wang et al., 1975). Diese Verteilung entlang der Aktin-Filamente führte letztlich zu der Namensgebung Filamin. Mit Hilfe der Filamin-Antikörper gelang es zu zeigen, dass Filamin-ähnliche Proteine in den Zellen diverser Vertebraten vorkommen (Shizuta et al., 1976; Wang et al., 1975). Die Entdeckung eines Filamin-Paralogs in *Dictyostelium discoideum* gelang einer Arbeitsgruppe, unabhängig von den oben beschriebenen Arbeiten, als sie nach Aktin-vernetzenden Faktoren suchte (Condeelis et al., 1981; Condeelis et al., 1982). Die beiden Genprodukte des *Drosophila melanogaster* Cheerio-Gens, dessen Mutation bei Taufliegen zu Sterilität führt, da sie nicht in der Lage sind funktionelle Ovarien-Ringkanäle zu formen, sind ebenfalls Filamin-Isoformen (Li et al., 1999; Sokol und Cooley, 1999).

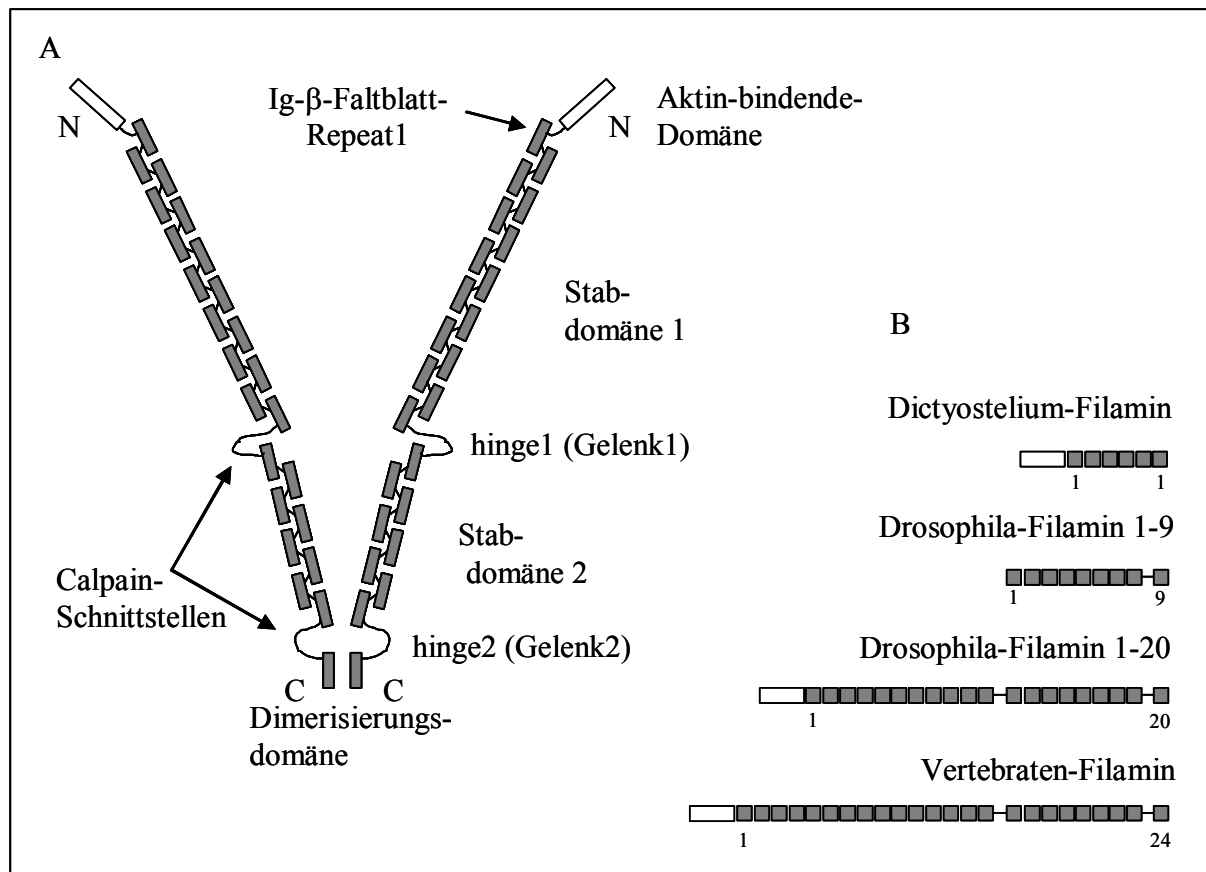
### **1.1 FLN: Aufbau und Isoformen**

Die Filamine der Vertebraten sind große 280 kDa Proteine. Sie bilden Homodimere und besitzen aminoterminal eine F-Aktin-bindende Domäne mit einem Sequenzmotiv, das sich in vielen Aktin-bindenden Proteinen, wie z.B.  $\beta$ -Spectrin, Dystrophin oder  $\alpha$ -Actinin findet (siehe Abb. I.1) (Lebart et al., 1994). Nach der F-Aktin-bindenden Domäne des Proteins folgen 24 Wiederholungssequenzen, bestehend aus jeweils ca. 96 Aminosäuren. Durch Strukturberechnungen wurde für diese Wiederholungen eine Immunglobulin-(Ig)- $\beta$ -Faltblattstruktur (Ig-Repeat) vorausgesagt. Diese Struktur erlaubt es den einzelnen Ig-Repeats vermutlich, sich so aneinander zu legen, dass sie insgesamt ein stabförmiges Protein bilden (Gorlin et al., 1990). Diese durch Berechnungen vorausgesagte stabartige Gesamtstruktur entspricht dem Bild, welches sich aus elektronenmikroskopische Untersuchungen von Filamin



ergibt (Hartwig und Stossel, 1981; Tyler et al., 1980). Eine Bestätigung der Ig-Faltblattstruktur durch Röntgenstrukturanalysen ist bisher nur für Dictyostelium-Filamin gelungen (Fucini et al., 1997).

Die verschachtelten Ig-Repeats werden, je nach Isoform ein oder zwei Mal durch flexible Gelenkregionen (hinge1 und hinge2) unterbrochen. Die Dimerisierung wird durch die letzte, carboxyterminal gelegene Wiederholung vermittelt (Li et al., 1999).



**Abb I.1.: Die Struktur von humanem FLNa und die Filamine verschiedener Organismen.**

(A) Humanes FilaminA besteht aus einer F-Aktin-bindenden Domäne und 24 aufeinander folgenden Ig-Repeats, die zwischen der 15 und der 16 und der 23 und der 24 Wiederholung durch eine flexible Gelenkregion unterbrochen werden. In den Gelenk- oder hinge-Regionen finden sich Schnittstellen für die Protease Calpain. Für die Dimerisierung ist nur die 24. Wiederholung nötig.

(B) Die Mindestanforderung an ein Protein, damit es zur Filamin-Familie gerechnet werden kann, ist eine Folge von Ig-β-Faltblatt-domänen. Die F-Aktin-bindende Domäne ist bei einem Drosophila-Filamin nicht vorhanden. Die hinge-Region findet man nicht bei Dictyostelium-Filamin. (Stossel et al., 2001).

Dadurch, dass die Filamin-Isoformen durch unterschiedliche Ansätze gefunden wurden, war die Benennung bisher wenig konsistent. Erst kürzlich wurde eine einheitliche Nomenklatur vorgeschlagen (Tab.I.1). Das Prinzip dieser einheitlicheren Namensgebung ist, dass der Abkürzung FLN immer als Prefix ein Hinweis auf den Organismus, aus dem das Filamin stammt, vorangestellt wird: hs steht dabei für Homo sapiens, gg für Gallus gallus, dm für Drosophila melanogaster, dd für Dictyostelium discoideum. Die alphabetische Benennung der

Vertebraten-Filamine als FLNa, FLNb und FLNc entspricht der Reihenfolge, in der jeweils die kompletten Sequenzdaten in der Datenbank erschienen. Dass die Filamine von *Drosophila* und *Dictyostelium* nicht entsprechend mit Buchstaben bezeichnet werden, soll ihre verwandtschaftlich größere Entfernung von den Vertebraten-Filaminen zum Ausdruck bringen (Stossel et al., 2001).

Neue Benennung	Bisherige Benennung	Anzahl Ig-Faltblätter
hsFLNa	ABP, ABP280, FLN1 Non-muscle FLN $\alpha$ FLN	24
hsFLNb	$\beta$ FLN, FH1, FLN3	24
ggFLNb	FLN	24
hsFLNc	$\gamma$ FLN, ABP-L, FLN2	24
ddFLN	ABP120, Gelationsfaktor	6
dmFLN1-20	Filamin-240, Filamin1	20
dmFLN1-9	Filamin90	9

**Tab. I.1: Benennung der Filamin-Isoformen.**

Die bisher bei Vertebraten gefundenen drei Isoformen (FLNa, FLNb und FLNc) haben eine Sequenzhomologie von 60–80% (Stossel et al., 2001). Während FLNa und FLNb jeweils in verschiedensten Geweben exprimiert werden, findet man FLNc vor allem im Skelett- und Herzmuskel (Stossel et al., 2001). Das FLNa-Gen ist beim Menschen und bei der Maus auf dem X-Chromosom lokalisiert (Chatterjee et al., 1994; Maestrini et al., 1990). Die Gene für FLNb und FLNc befinden sich beim Menschen auf dem 3. und 7. Chromosom und bei der Maus auf dem 14. und 6. Chromosom (Gariboldi et al., 1994, Maestrini et al., 1990; Zang et al., 1998). Alle drei Vertebraten-Filamine wie auch *Drosophila*-Filamin (dmFLN1-20) kommen auch als Splicevarianten vor. Während der Bildung von Myotuben wird beispielsweise aus der mRNA von FLNb und FLNc die hinge1-Region durch Splicing entfernt. Dies führt zu einer veränderten Lokalisation dieser beiden Filamin-Isoformen in Muskelzellen. Splicevarianten von FLNa und FLNb besitzen unterschiedliche Bindungseigenschaften für Integrine (van der Flier et al., 2002).

FLNc besitzt als einzige Filamin-Isoform einen ca. 80 Aminosäuren langen Einschub im 20. Ig-Repeat. Dieser Einschub vermittelt vermutlich ebenfalls die Interaktion mit speziellen Bindungspartnern (Xie et al., 1998).

## 1.2 FLN: Aktin-Bindung

Filamin ist das potenteste aller F-Aktin-vernetzenden Proteine (Brotschi et al., 1978). Ein molares Filamin/Aktin-Verhältnis von 1 zu 700 ist für eine Aktin-Vernetzung bereits ausreichend, somit genügt in etwa ein Filamin-Dimer pro Aktin-Filament, um eine Aktin-Gelbildung zu induzieren (Ito et al., 1992; Stossel et al., 2001). Vermutlich ist es die flexible Geometrie die Filamin zu dem stärksten bisher bekannten Aktin-Filament-Vernetzer macht. Diese besondere Flexibilität besitzt Filamin dank der Kombination von (1) N-terminaler Aktin-Bindung, (2) C-terminaler Dimerisierung, (3) einem langen stabförmigen Charakter des Proteins und (4) dem Vorhandensein flexibler Gelenkregionen (Abb.I.1). Bei einem Vergleich der Aktin-Bindungsstärken verschiedener Aktin-Filament-Vernetzer fällt Filamin zumindest nicht durch eine höhere Aktin-Affinität auf (Goldmann und Isenberg, 1993; Honda et al., 1999; Matsudaira, 1994). Betrachtet man durch Filamin in vitro vernetzte Aktin-Filamente elektronenmikroskopisch, findet man Filamentverzweigungen mit auffallend großem Winkel. Die Filamentverzweigungen sehen zumeist T- oder Y-förmig aus (Hartwig et al., 1980). Viele Details der Filamentvernetzung durch Filamin konnten bis heute nicht geklärt werden. Sicher ist, dass Filamin für die Vernetzungsaktivität als Dimer vorliegen muss (Weihing, 1988) und, dass die N-terminalen, Aktin-bindenden Domänen intakt sein müssen (Bresnick et al., 1990). Einzelheiten der Filamentvernetzung und auch die Frage, wie wichtig Filamin in vivo für die Verzweigung von kortikalem Aktin-Filamenten ist, werden zukünftige Untersuchungen beantworten müssen. In einem Modell, das in den letzten Jahren zunehmend diskutiert wurde, werden in erster Linie die Proteine des Arp2/3-Komplexes in diesem Zusammenhang als wesentlich genannt (Pollard und Borisy, 2003). Das Zusammenwirken von Filamin und dem Arp2/3-Komplex ist erst wenig erforscht. Die Vermutung, dass Filamin den durch den Arp2/3-Komplex initiierten Aktinfilamentverzweigungen die nötige Stabilität gibt, wird durch Untersuchungen an FLNa-defizienten Zellen unterstützt. FLNa-defiziente Melanomzellen können ihre Oberflächen nicht stabilisieren, statt Filopodien auszubilden, wie andere Melanomzellen dies tun, werden über einen längeren Zeitraum wiederholt nur kleine Ausstülpungen (sogenannte „blebs“) vorgeschoben und wieder eingezogen. Die FLNa-defizienten Melanomzellen sind nicht motil. Die beschriebenen „Probleme“ haben die Zellen nach stabiler Transfektion von FLNa nicht mehr (Cunningham et al., 1992). In FLNa-defizienten Zellen findet man die Proteine des Arp2/3 Komplexes stark exprimiert, ein Umstand der jedoch offensichtlich nicht ausreicht, um die Membranen zu stabilisieren und Motilität zu ermöglichen. Ferner haben die durch den Arp2/3-Komplex gebildeten F-Aktin-Verzweigungen prinzipiell einen Winkel von 70°; man findet im kortikalen Aktin-Netzwerk aber auch Verzweigungen mit anderen Winkeln (Stossel et al., 2001). Die genannten

Argumente deuten darauf, dass Filamin, neben dem Arp2/3, für eine physiologische F-Aktin-Verzweigung nötig ist. Die Bedeutung von Filamin für die Zellmotilität wurde außer an Melanomzellen auch an Dictyostelium-Amöben gezeigt. Wird in diesen Filamin durch homologe Rekombination ausgeschaltet, können die Amöben keine breiten Membranregionen mehr vorschieben und sind dadurch in ihrer Motilität, und auch in ihrer Fähigkeit zur Phagozytose stark gestört (Stossel et al., 2001).

Menschen, deren FLNa-Gen verschiedene Mutationen aufweist, leiden unter der Krankheit Periventriculäre Heterotopie. Es handelt sich hierbei um ein X-chromosomales Syndrom, das bei Frauen unter anderem zu Epilepsie führt (Fox et al., 1998). Bei Betroffenen sind aufgrund einer gestörten Migration von Zellen während der Gehirnentwicklung neuronale Zellkörper entlang des lateralen Ventrikels angesammelt. Die Zellkörper sind die Ursache der epileptischen Anfälle. Bei den meisten betroffenen Familien führt die Vererbung der Mutation bei männlichen Nachkommen zur Letalität im frühen Embryostadium. Offensichtlich ist die wichtige embryonale Zellmigration der frühen embryonalen Stadien ohne Filamin nicht in ausreichendem Maße möglich (Stossel et al., 2001).

### 1.3 FLN-Interaktionen

Außer Aktin bindet Filamin eine Vielzahl weiterer Proteine. Besonders in den letzten Jahren sind durch die zunehmende Anwendung des „Yeast two-hybrid“-Systems viele neue Interaktionspartner gefunden worden. Unter den über 20 bisher beschriebenen Bindungspartnern (Tab.I.2) findet man auffallend viele membranständige Rezeptoren. Neben der bereits beschriebenen Vernetzung von Aktin-Filamenten besteht eine weitere Funktion von Filamin in der Anbindung von Aktin-Filamenten an die Membran. Eine Anbindung deren Bedeutung, außer im Sinne von mechanischer Stabilität, auch im Kontext der Signaltransduktion verstanden werden kann. Tumorzellen, die kein FLNa besitzen, sind schlechter gegen mechanische Beanspruchung geschützt (Glogauer et al., 1998). Ein Umstand, der sich auf die fehlende Interaktion von Filamin und  $\beta$ 1-Integrin zurückführen lässt: Zellen die erhöhtem mechanischen Stress ausgesetzt sind, bilden vermehrt Filamin- $\beta$ 1-Integrin-Komplexe aus und ihre Membranen werden nach mechanischer Beanspruchung messbar zugfester. Die Membranen von FLNa-Minus-Zellen zeigen dagegen nach mechanischem Stress keine signifikant erhöhte Festigkeit (Glogauer et al., 1998; Kainulainen et al., 2002). Ob die zusätzlichen Aktin-Membran-Anbindungen über die Filamin-Integrin-Komplexe dabei nur eine stabilisierende Bedeutung haben, oder ob Filamin in diesem Zusammenhang auch als Integrator von Signalen dient, ist nicht abschließend geklärt.

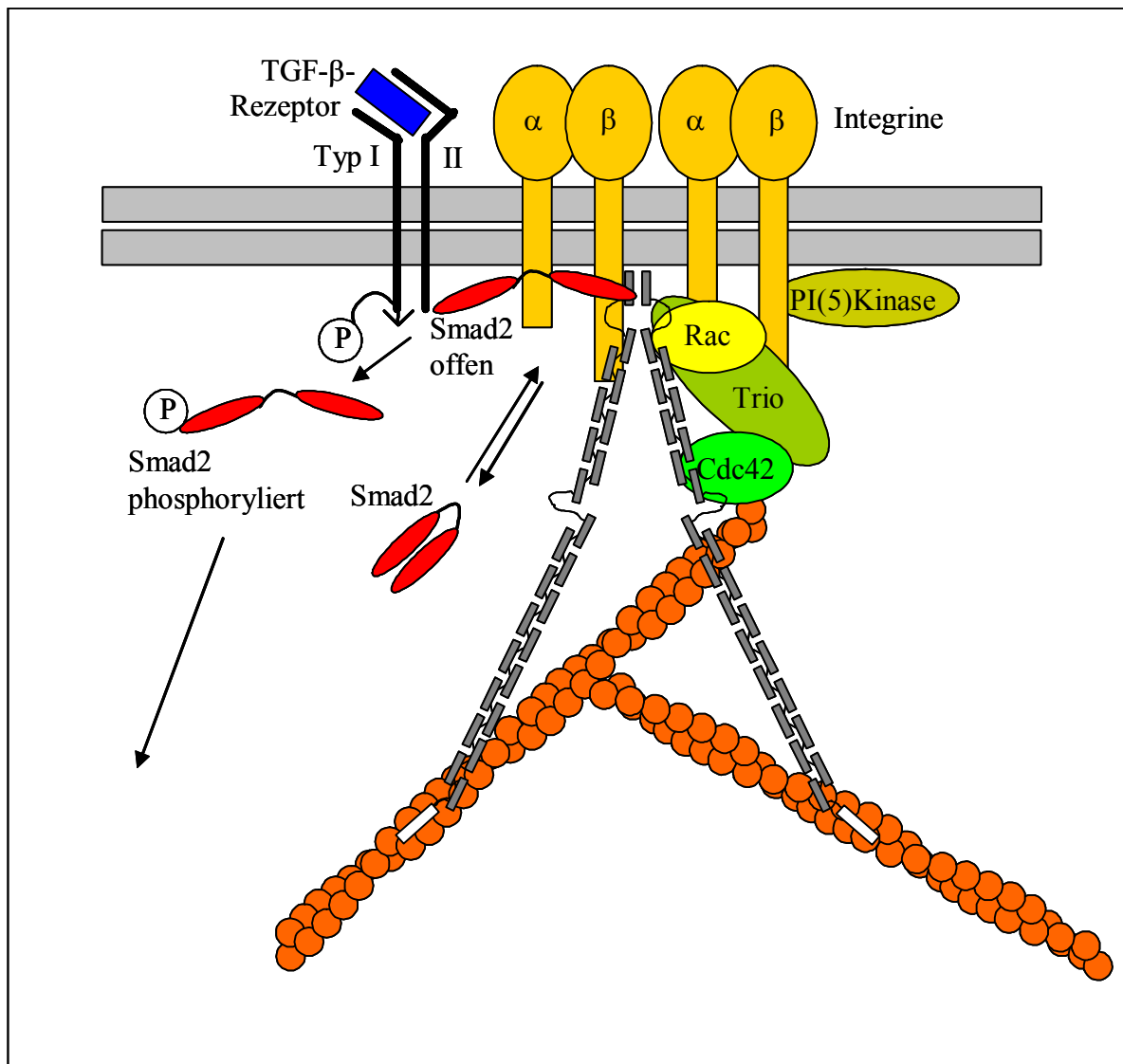
Insgesamt konnte die Bedeutung von Filamin für die Signaltransduktion mit verschiedenen Untersuchungen bekräftigt werden. Die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion ist ohne FLNa als Bindungspartner für das Smad2-Protein nicht möglich. Diese werden erst durch ihre Interaktion mit Filamin in die Nähe der TGF- $\beta$ -Rezeptoren gebracht und eventuell durch die Bindung an Filamin in eine offene, phosphorylierbare Form überführt. Eine Phosphorylierung der Smads durch die Rezeptoren ist in FLNa-defizienten Zellen nicht möglich. Als Konsequenz ist in diesen Zellen praktisch die gesamte TGF- $\beta$ -Signaltransduktion ausgeschaltet. Transfiziert man diese Zellen mit FLNa, ist eine TGF- $\beta$ -Signaltransduktion wieder möglich (Sasaki et al., 2001).

Die Familie der Rho-GTPasen ist von zentraler Bedeutung für die Regulation der Aktin-Organisation (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Die beschriebenen Interaktionen von Filamin mit Rho-GTPasen wie Cdc42, RhoA, Rac1 und RalA und die Interaktion mit Trio, einem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für Rac und Cdc42, weisen auf eine Bedeutung Filamins im Kontext der Aktin-organisierenden Signaltransduktion hin (Bellanger et al., 2000; Marti et al., 1997; Ohta et al., 1999)

Bindungspartner	Interaktionsdomäne der Filaminsequenz	Funktion der Interaktion
Glycoprotein Iba $\alpha$	UE 17-19 (FLNa,b)	Zellausbreitung
Integrine ( $\beta$ 1A, $\beta$ 1D, $\beta$ 2, $\beta$ 3, $\beta$ 7)	C-terminale Hälfte	Mechanische Stabilisierung
Tissue Factor	UE 23-24	
FcRI(CD64)		Liganden-sensitive Dissoziation
Furin	UE 13-14	Kompartimentalisierung des Furins
$\delta$ -Sarcoglycan	UE 23-24 (hsFLNc)	Mögliche Rolle bei Muskeldystrophie
Myotilin	UE 19-21 hsFLNc	Mögliche Rolle bei Muskeldystrophien
FATZ	hsFLNc	Z-Scheiben-Lokalisation
Caveolin-1	C-terminale Hälfte	
Presenilin	C-terminale Hälfte (hsFLNa, b und dmFLN1)	FLN1 Überexpression inhibiert den Phänotyp der Presenilin Überexpression in Drosophila
Dopamin-D <sub>2</sub> -Rezeptor	UE 16-19	Abgeschwächte Antwort auf Dopamin in FLN-defizienten Zellen
Granzym B	UE 24	Funktion in der Granzym B vermittelten Apoptose
Toll	UE 21-24 (dmFLN1)	
TRAF2	UE 21-24	FLNa Überexpression verhindert NF $\kappa$ B und SAPK Aktivierung
SEK-1	UE 21-24	FLN-SEK-1-Komplex aktiviert SAPK
Androgen Rezeptor	C-terminale Hälfte	Keine Translokation des Rezeptors bei FLN-Defizienz
Rho, Rac, Cdc42	UE 21-24	
RalA	UE 24	Fördert die Bildung von Microspies
Trio	UE 23-24	Zellform
cvHSP	UE 21-24	
Hepatitis-B-Virus-Protein	C-terminale Hälfte	
Kv4.2-Kalium-Kanal	C-terminale Hälfte	Beeinflusst die Funktion des Kanals
SMAD		TGF- $\beta$ Signaltransduktion
(Stossel et al., 2001)		

**Tab. I.2: Proteine, die mit Filamin interagieren.**

Auch die Analyse von Filamin-defizienten Dictyostelium-Amöben ergab, außer der bereits erwähnten gestörten Motilität und Phagozytose, dass diese auch in ihrer Fähigkeit zur Photo- und Thermotaxis beeinträchtigt sind (Fisher et al., 1997). Ergebnisse die ebenfalls durch eine gestörte Signaltransduktion erklärbar wären.



**Abb. I.2: Filamin als Integrator verschiedener Signaltransduktionswege.** Außer der Vernetzung von Aktinfilamenten interagiert Filamin mit diversen Transmembranproteinen wie z.B. Integrinen. Die dargestellte, potentielle Organisation Filamins an der Plasmamembran, könnte Filamin erlauben, als ein Gerüst (Skaffold) für verschiedene Signaltransduktionswege zu dienen. Die Interaktion der C-terminalen Region von Filamin mit den kleinen GTPasen Cdc42 und Rac und auch mit dessen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Trio lässt die Vermutung zu, dass Filamin auch an dessen Signaltransduktion beteiligt ist. Aktiviertes Rac interagiert vermutlich mit der Phosphatidylinositol-5-Kinase (PI(5)Kinase), die den Aufbau von Aktinfilamenten aus G-Aktin fördert. Smad2 interagiert mit Filamin, was die Phosphorylierung von offenem Smad2 durch die dimerisierten TGF-β-Rezeptoren vermittelt. Das phosphorylierte Smad2 kann dann im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren im Kern die Transkription verschiedener Gene steuern. (Sasaki et al., 2001; Stossel et al., 2001).

## 1.4 FLN: Regulation der Funktionen

Obwohl es vielfältige Hinweise bezüglich der Beteiligung Filamins an Signaltransduktionswegen gibt, ist wenig darüber bekannt, wie dies die Funktion von Filamin beeinflusst. Dass Filamin *in vitro* durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) phosphoryliert wird, konnte bereits 2 Jahre nach der ersten Aufreinigung von Filamin demonstriert und kurz darauf auch *in vivo* bestätigt werden (Davies et al., 1977; Wallach et

al., 1978b). In den folgenden Jahren fand man, dass Filamin ein Substrat verschiedener Kinasen ist. So wird Filamin in vitro auch durch PKC (Kawamoto und Hidaka, 1984), durch die Casein-Kinase I und II (Nakajo et al., 1987), durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaM-KinaseII) (Ohta und Hartwig, 1995), durch die p90-ribosomale-S6-Kinase (Ohta und Hartwig, 1996), durch die p21-aktivierte Kinase 1 (Pak1) (Vadlamudi et al., 2002) und durch die p56(lck)-Kinase (Goldmann, 2002) phosphoryliert. Die In-vivo-Phosphorylierung konnte jedoch neben PKA bisher nur für die p90-ribosomale-S6-, für die Pak1-Kinase und, wie in dieser Arbeit gezeigt, für PKC bestätigt werden (Ohta und Hartwig, 1996; Tigges et al., 2003; Vadlamudi et al., 2002; Wallach et al., 1978a). Es gibt verschiedene Filaminfunktionen, für die ein Phosphorylierungseinfluss in vitro festgestellt werden konnte. Die Filamin-Aktin-Bindung lässt sich durch die Phosphorylierung Filamins mit der CaM-KinaseII inhibieren (Ohta und Hartwig, 1995). Die Spaltung Filamins durch Calpain, wie sie z.B. in aktivierten Blutplättchen (Onji et al., 1987) oder während der Myoblastenfusion (Kwak et al., 1993) zu beobachten ist, könnte durch die Filamin-Phosphorylierung durch PKA reguliert werden. In vitro inhibiert die Phosphorylierung durch PKA die Spaltung Filamins durch Calpain (Jay et al., 2000). Insgesamt weisen die meisten Untersuchungen zur Filamin-Phosphorylierung darauf hin, dass die Lokalisation von Filamin durch das Zusammenspiel verschiedener Kinasen reguliert wird. Die Bindungseigenschaften Filamins werden durch Phosphorylierung moduliert. Wird die Affinität Filamins für Proteine des Zytoskeletts durch Phosphorylierung verändert, sollte dies zu veränderten Zytoskelettstrukturen führen. So wird vermutet, dass die Bindungseigenschaften Filamins für Integrine durch eine Phosphorylierung über die p56(lck)-Kinase verändert werden (Goldmann, 2002). Ebenfalls durch diese Kinase wird eventuell die Wechselwirkung Filamins mit den Lipiden der Membran reguliert (Goldmann, 2001; Goldmann, 2002). Die durch Thrombin induzierte Reorganisation des Zytoskeletts in Endothelzellen, geht mit der Phosphorylierung Filamins durch die CaM-KinaseII einher (Borbiev et al., 2001). Die Phosphorylierung Filamins durch die Pak1-Kinase hat vermutlich ebenfalls Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts. Diese Kinase reguliert die Bildung von Ruffles, braucht dafür aber Filamin als Substrat. Dies wurde durch Versuche an FLNa-negativen Myelomazellen demonstriert. In diesen Zellen ist die Pak1-Regulation der Ruffles ausgeschaltet. Wird in die gleiche Zelllinie FLNa stabil oder transient transfiziert, ist die Pak1-Regulation und die Ausbildung der Ruffles wieder möglich (Vadlamudi et al., 2002).

Auch die bereits beschriebene „Mechanoprotektion“ durch Filamin, bei der in Zellen nach mechanischer Beanspruchung mehr Filamin- $\beta$ 1-Integrin-Komplexe ausgebildet werden, geht einher mit der vermehrten Phosphorylierung Filamins. Diese durch mechanische



Beanspruchung verursachte Phosphorylierung lässt sich durch Bisindolymaleimid (BIM), einem spezifischen Inhibitor für konventionelle PKCs, inhibieren (Glogauer et al., 1998).

## 2 PKC

Die Proteinkinase C (PKC) Familie gehört zur Gruppe der Serin/Threonin-spezifischen Kinasen. Sie wurde zuerst 1977 beschrieben, als es der Arbeitsgruppe von Nishizuka in Kobe gelang, aus Rattengehirnen eine Kinase-Aktivität zu isolieren, die durch limitierte Proteolyse aktiviert werden konnte (Inoue et al., 1977). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Kinase-Aktivität in calciumabhängiger Weise durch Phosphatidylserin (PS), durch Diacylglycerol (DAG) und auch durch Phorbolester wie TPA induziert werden kann (Nishizuka, 1984). Versuche, die verantwortliche Kinase chromatographisch aufzureinigen, verdeutlichten, dass es sich de facto um drei unterscheidbare Proteine handelt, die als Isotypen alpha, beta und gamma bezeichnet wurden (Huang et al., 1986). In den folgenden Jahren erwies es sich, dass es sich bei dem neuen Kinasentyp tatsächlich um eine Familie biochemisch sehr ähnlicher Kinasen handelt. Charakteristisch für die PKC-Familie ist eine konservierte Kinaseuntereinheit und, in unterschiedlichem Maße, das Vorhandensein konservierter Motive in der regulatorischen Untereinheit. Unterscheiden lassen sich die bis heute beschriebenen 10 PKC-Isotypen anhand der molekularen Organisation ihrer regulatorischen Untereinheit und der variablen hinge-Region (Dekker und Parker, 1994).

### 2.1 Die PKC-Isotypen

Auf der Basis unterschiedlicher Aktivierbarkeit durch allosterische Aktivatoren werden die PKC-Isotypen in drei Gruppen aufgeteilt: (1) Die konventionellen PKCs oder cPKCs ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$ ), 2) die neuen PKCs oder nPKCs ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  und  $\eta$ ) und (3) die atypischen PKCs oder aPKC ( $\zeta$  und  $\iota/\lambda$ ).

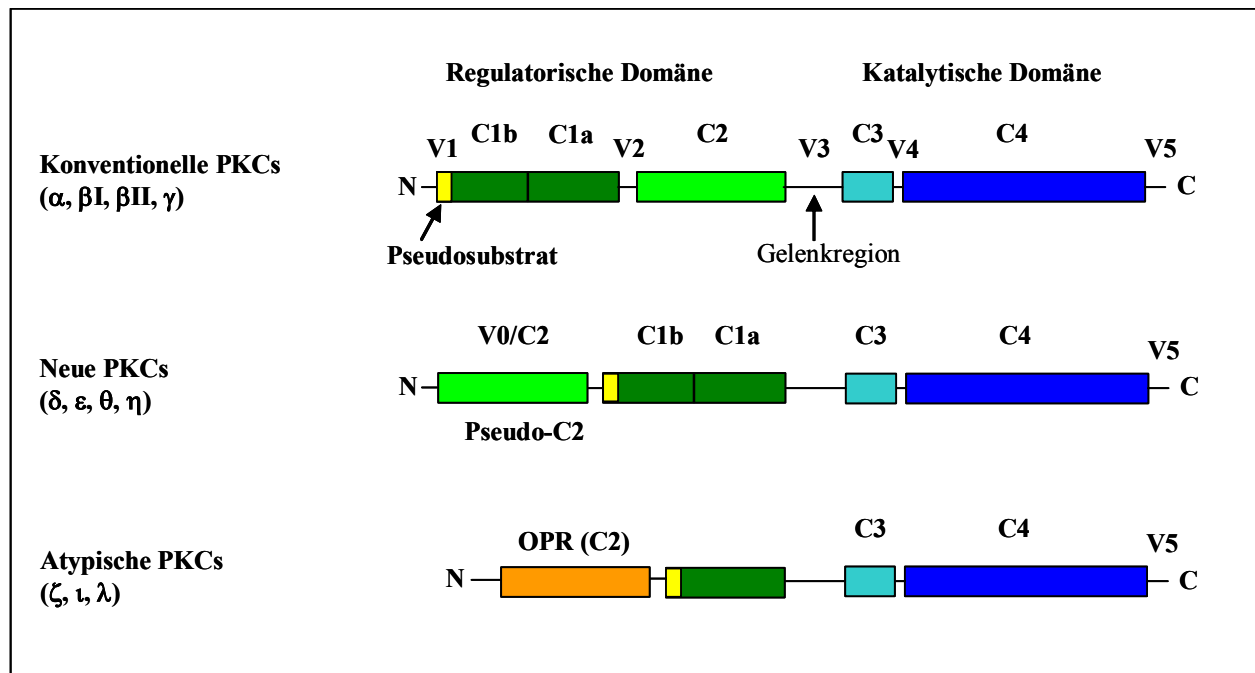
Die konventionellen PKCs werden durch Diacylglycerol (DAG), Phosphatidylserin (PS) und Calcium oder durch Phorbolester, PS und Calcium aktiviert. Die neuen PKCs binden nicht an Calcium. Die atypischen PKCs können zwar durch Phospholipide und Fettsäuren, aber nicht durch DAG, Phorbolester und Calcium aktiviert werden (Dekker und Parker, 1994).

Die beschriebenen Unterschiede in der Aktivierbarkeit werden verständlich, wenn man die Unterschiede im molekularen Aufbau der PKCs betrachtet. Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Isotypen weisen konservierte Regionen – im Fall der cPKCs vier Regionen (C1-C4) – und isotypische, variable Regionen auf; für die cPKC die Regionen V1-V5

(Abb.I.3). Alle bisher gefundenen PKC-Isotypen besitzen, wie erwähnt, eine konservierte Kinaseuntereinheit. Sie besteht aus den variablen Regionen V4 und V5, einem konservierten ATP-Bindungsmotiv (C3) und einem konservierten aktiven Zentrum (C4) (Abb.I.3).

Im Gegensatz zu der relativ großen Homologie im Aufbau und in der Aminosäuresequenz der Kinaseuntereinheiten, weist die regulatorische Untereinheit deutliche Unterschiede bezüglich der Aminosäuresequenz, dem Aufbau und der Anordnung der konservierten Domänen auf.

Da ist zunächst einmal die C1-Domäne der konventionellen und neuen PKC-Isotypen. Sie besteht aus 2 homologen cysteinreichen Zinkfinger-Motiven (C1a und C1b), welche die Bindung an DAG und Phorbolster vermitteln. Atypische PKCs besitzen nur eine verkürzte C1-Domäne, bestehend aus einem einzelnen Zinkfinger-Motiv, dem kritische Aminosäuren zur Bindung von DAG und Phorbolster fehlen. Vom N-Terminus aus betrachtet, liegt direkt vor jeder C1-Domäne ein kurzer Sequenzabschnitt, der ein PKC-Phosphorylierungsmotiv besitzt. Allerdings ist das Serin oder Threonin, das hier durch PKC phosphoryliert würde, durch ein Alanin ersetzt. Diese Pseudosubstrat-Region, die bei allen PKC-Isoformen zu finden ist, interagiert mit der Kinaseuntereinheit und hält die Kinase inaktiv, so lange keine allosterischen Aktivatoren anwesend sind. Die Bindung von Calcium und Phosphatidylserin an die regulatorische Untereinheit der konventionellen PKCs wird durch die C2-Domäne vermittelt. Von den nicht durch Calcium aktivierbaren PKCs wurde lange Zeit angenommen, dass sie keine C2-Domäne besitzen. Tatsächlich findet man aber in den neuen und auch in den atypischen PKCs Sequenzbereiche, die Ähnlichkeit mit der C2-Domäne der konventionellen PKCs haben. Diese zuvor V0 genannte, aminoterminal gelegene Domäne wird in der Literatur als C2, C2-artig, Pseudo-C2, oder im Fall der atypischen PKCs auch als OPR-Domäne bezeichnet. Trotz der im Vergleich zur C2-Domäne der konventionellen PKCs sehr ähnlichen Faltung, fehlen diesen Domänen kritische Aminosäuren zur Bindung von Calcium (Pappa et al., 1998).



**Abb. I.3: Schematische Darstellung des Aufbaus der drei PKC-Isotypen.** Gelb dargestellt ist die Pseudosubstrat-Region, die mit der Kinaseuntereinheit der PKCs eine intramolekulare Wechselwirkung eingeht. Dunkelgrün ist die C1-Domäne. Bei den konventionellen und neuen PKCs ist die C1-Domäne unterteilt in C1a und C1b und vermittelt die DAG- und Phorbol ester-Bindung. Die C2-Domäne der konventionellen und die Pseudo-C2-Domäne der neuen PKCs sind hellgrün dargestellt. Bei den konventionellen PKCs vermittelt die C2-Domäne die Calcium- und PS-Bindung. Die ebenfalls C2-ähnliche OPR-Domäne (Octicosapeptide Repeat) der atypischen PKCs ist in orange dargestellt, ihr fehlen, wie auch der Pseudo-C2-Domäne der neuen PKCs, kritische Aminosäuren zur Bindung von Calcium. Die ATP-bindende C3- und die Substrat-bindende C4-Domänen des katalytischen Teils der PKCs sind in hellblau und dunkelblau zu sehen. Die variablen Regionen der PKCs (V) sind bei allen Isotypen als Striche dargestellt (Heldin und Purton, 1996; Newton, 1997; Ohno und Nishizuka, 2002).

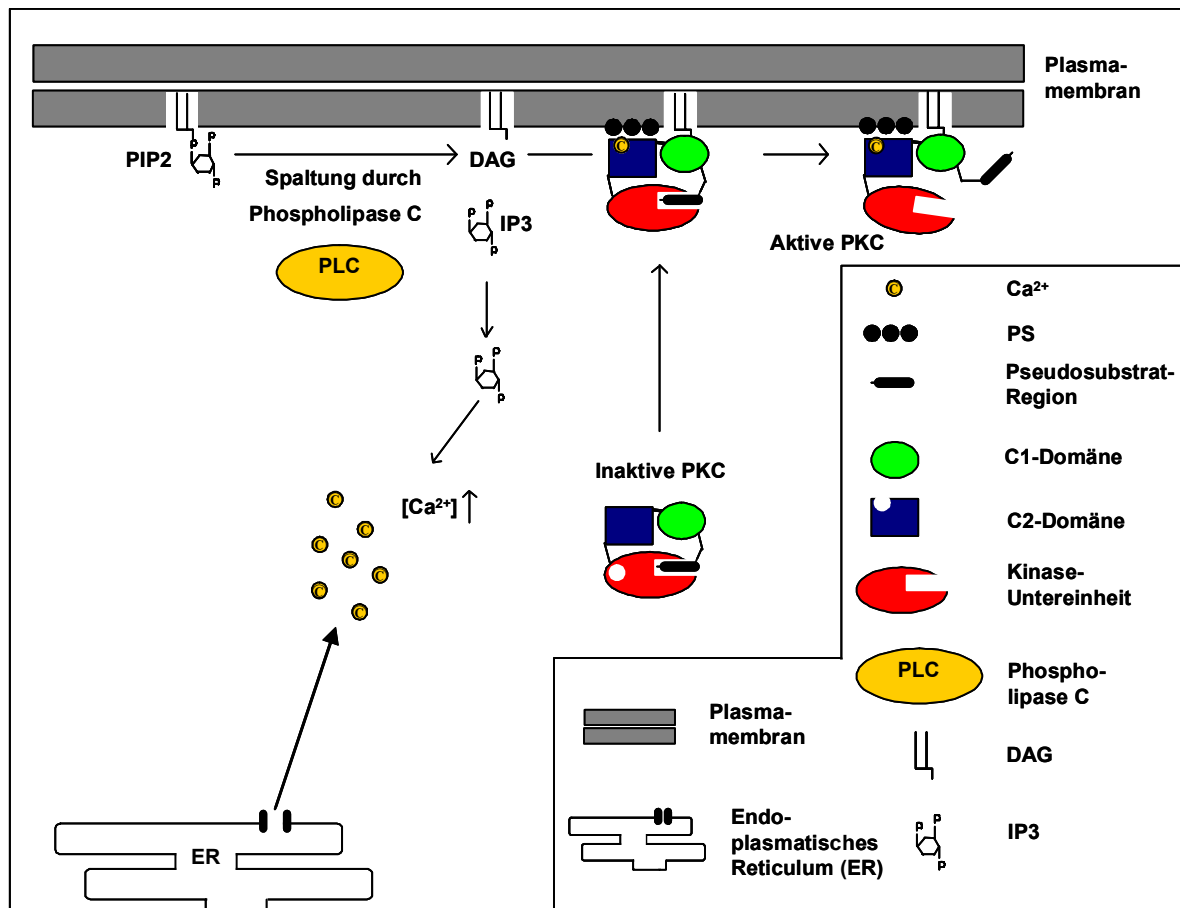
Durch die in den vergangenen Jahren zunehmende Fülle von Sequenzdaten, ist das Bild einer erweiterten PKC-Superfamilie entstanden. Hierzu werden beispielsweise auch die PKC-related-Kinases (PRKs) gezählt (Mellor und Parker, 1998). PRKs unterscheiden sich von den PKCs durch das Fehlen der C1-Domäne und durch den Besitz von drei zusätzlichen, N-terminalen Homology-Region1-Motiven (HR1). Vermittelt durch die HR1-Motive können PRKs als einzige Serin/Threonin-Kinasen durch Rho-GTPasen aktiviert werden (Mellor und Parker, 1998). Ihre *in vitro* beobachtete Aktivierung durch Fettsäuren und Phospholipide konnte *in vivo* noch nicht bestätigt werden (Morrice et al., 1994; Palmer et al., 1995). Der Umstand, dass die Expression von dominant negativem PRK2 in Fibroblasten zu einer gestörten Aktinorganisation führt, deutet darauf hin, dass diese Kinase an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist (Vincent und Settleman, 1997).

Eine Art Archetyp-PKC findet man in *Saccharomyces cerevisiae*. Dieser Organismus besitzt nur einen PKC-Isotyp (Pkc1). Doch diese mit ihren 132 kDa deutlich größte PKC vereinigt in sich alle bekannten PKC-Domänentypen. Pkc1 besitzt sowohl zwei der drei HR1-Domänen, der PRKs als auch alle Domänen der Vertebraten PKCs (Mellor und Parker, 1998).

## 2.2 PKC: Regulation der Funktion und Bindungspartner

Nachdem die Aktivierungsmechanismen der konventionellen PKCs durch DAG und Phorbol ester auch in vivo bestätigt werden konnten, wurde die Bedeutung der PKC bald im Sinne eines Schlüsselregulators für Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und einer Vielzahl weiterer Prozesse bis hin zur Carcinogenese verstanden (Nishizuka, 1995). Der größte Teil der über 10.000 Arbeiten zur Funktion und Bedeutung der PKC wurde allerdings mit Hilfe von pharmakologischen Versuchsansätzen durchgeführt. Berücksichtigt man, dass sowohl Phorbol ester als auch einige der häufig genutzten PKC-Inhibitoren bezüglich ihrer Spezifität für PKC überschätzt wurden (Kazanietz, 2000; Wilkinson und Hallam, 1994) (Davies et al., 2000), ergab sich die Situation, dass eine Neubewertung der zentralen Rolle der PKC für einige zelluläre Prozesse nötig erschien. Die C1-Domäne, die die Bindung der PKCs an Phorbol ester vermittelt, wurde mittlerweile in diversen weiteren Proteinen gefunden. Proteine, von denen einige wie Chimaerin-, Munc13- oder RasGRP-Isozyme ebenfalls durch DAG und Phorbol ester aktiviert werden können. Konsequenterweise gibt es heute diverse zelluläre „PKC-Prozesse“, von denen man in den letzten Jahren lernte, dass sie nicht alleine (oder gar nicht) durch PKCs reguliert werden (Kazanietz, 2002). Da aber gleichzeitig die gefundenen Mitglieder der PKC-Familie immer zahlreicher wurden, bleibt die Summe der PKC Funktionen verblüffend hoch, zumal die Tatsache, dass viele Isotypen in den gleichen Geweben und Zellen nebeneinander exprimiert werden, der Annahme widerspricht, dass die Vielfältigkeit der PKC-Familie in erster Linie ein Redundanz-Phänomen ist.

Die Größe der PKC-Familie und das Auftreten verschiedener Isotypen in der gleichen Zelle ergab dabei noch ein weiteres Problem. Das Modell, wie Signaltransduktion über PKC funktionieren könnte, das sich recht bald nach Aufklärung der allosterischen Aktivierung durch DAG durchsetzte, war relativ simpel: DAG entsteht lokal in der Membran durch die Spaltung von  $\text{PIP}_2$  durch Phospholipasen. Das Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ), das ebenfalls durch die Spaltung von  $\text{PIP}_2$  entsteht, führt zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Reticulum (ER). Inaktive, cytoplasmatische PKC wird durch DAG und PS an die Membran rekrutiert. Durch die Calcium- und Membranbindung wird in der PKC eine Konformationsänderung induziert. Die Pseudosubstrat-Region löst sich von der Kinaseuntereinheit. Die Kinase ist aktiv (Abb.I.4) (Nishizuka, 1986).



**Abb.I.4: Das klassische Modell der PKC-Regulation durch Calcium- und Lipid-Signalmoleküle.** DAG und IP<sub>3</sub> entstehen durch die Spaltung von PIP<sub>2</sub>, vor allem durch die Phospholipase C. Eine erhöhte IP<sub>3</sub>-Konzentration in der Zelle führt zu einer erhöhten Calcium-Konzentration durch die Freisetzung von Calcium aus dem ER. Die Bindung von Calcium, Membran-gebundenem PS und DAG durch die C1- und C2-Domäne der PKC führt zu einer Konformationsänderung und als Konsequenz daraus zu einer Aktivierung der PKC (Abb. modifiziert nach Heldin und Purton, 1996; Newton, 1997; Parekh et al., 2000).

So überzeugend dieses Modell auch ist, lässt sich mit ihm nicht erklären, wie unterschiedliche PKC-Isotypen im gleichen Zelltyp verschiedene zelluläre Funktionen regulieren können; zumal die Substratspezifität der verschiedenen PKC-Isotypen sich *in vitro* nicht wesentlich unterscheidet (Jaken und Parker, 2000; Mellor und Parker, 1998). Setzt man voraus, dass das Modell der PKC-Lipid-Interaktion prinzipiell stimmt, so ist es in jedem Fall nötig, dem Modell weitere Faktoren hinzuzufügen. Diese sollten erklärbar machen, warum nur bestimmte PKC-Isotypen innerhalb einer Zelle als Reaktion auf einen spezifischen Stimulus an definierte Plasmamembranbereiche rekrutiert werden, wie das mit Fluoreszenzstudien für einige PKC-Isotypen überzeugend gezeigt werden konnte (Kiley und Parker, 1995). Ein Faktor der sich hier anbietet, ist die Interaktion zwischen PKC und weiteren Proteinen. Derartige Wechselwirkungen könnten PKC-Isotypen mit hoher Selektivität lokalisieren. Beispiele für Protein-Protein-Interaktionen, mit deren Hilfe Kinasen in spezifischen Regionen der Zelle lokalisiert werden, sind seit der Entdeckung der SH2- und SH3-Domänen bei Tyrosin-

Kinasen (Koch et al., 1991) wiederholt beschrieben worden. PH- und LIM-Domänen (Gill, 1995; Pawson, 1995) sind weitere bekannte Beispiele für Protein-Module, über die Enzyme oder andere Proteine in der Zelle lokalisiert werden. So verwundert es nicht, dass es eine zunehmende Zahl von Arbeiten gibt, die demonstrieren, dass auch PKC-Isotypen via Protein-Protein-Interaktionen spezifisch in Subregionen der Zelle angereichert werden. (Jaken und Parker, 2000; Mochly-Rosen, 1995; Newton, 1996).

Im Vergleich zu dem oben beschriebenen Aktivierungsmodell hat sich das Bild, das man von der Regulation der PKC-Isotypen hat, deutlich differenziert: Lipide und Calcium lokalisieren und aktivieren, wie beschrieben, in unterschiedlichem Maße PKC-Isotypen. Für die „Feinjustierung“ der PKC-Funktionen werden zusätzlich Proteinwechselwirkungspartner benötigt. Sie spielen im Übrigen vermutlich nicht nur die Rolle, verschiedene PKC-Isotypen in die Nähe verschiedener Substratproteine zu rekrutieren. Manche Wechselwirkungspartner halten wahrscheinlich die PKC in Subregionen der Zelle zurück und verhindern so „unerwünschte“ Phosphorylierungen. PKC-Interaktionen mit Transportvesikeln könnten der PKC „Mitfahrgelegenheiten“ bieten und so für die beobachtbare Dynamik mancher PKC-Isotypen verantwortlich sein, die sich beispielsweise wie PKC $\delta$  oder PKC $\eta$  zwischen dem Golgi und dem Nukleus, hin und her bewegen (Goodnight et al., 1995). Des Weiteren gibt es Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, die dahin deuten, dass PKC-Protein-Interaktionen die Integration von Informationen anderer Signaltransduktionswege vermitteln. So interagieren verschiedene Proteine mit PKC und gleichzeitig mit anderen Kinasen. Adducin wird beispielsweise durch PKC, PKA und durch die Rho-Kinase phosphoryliert (Dong et al., 1995; Kimura et al., 1998; Matsuoka et al., 1996).

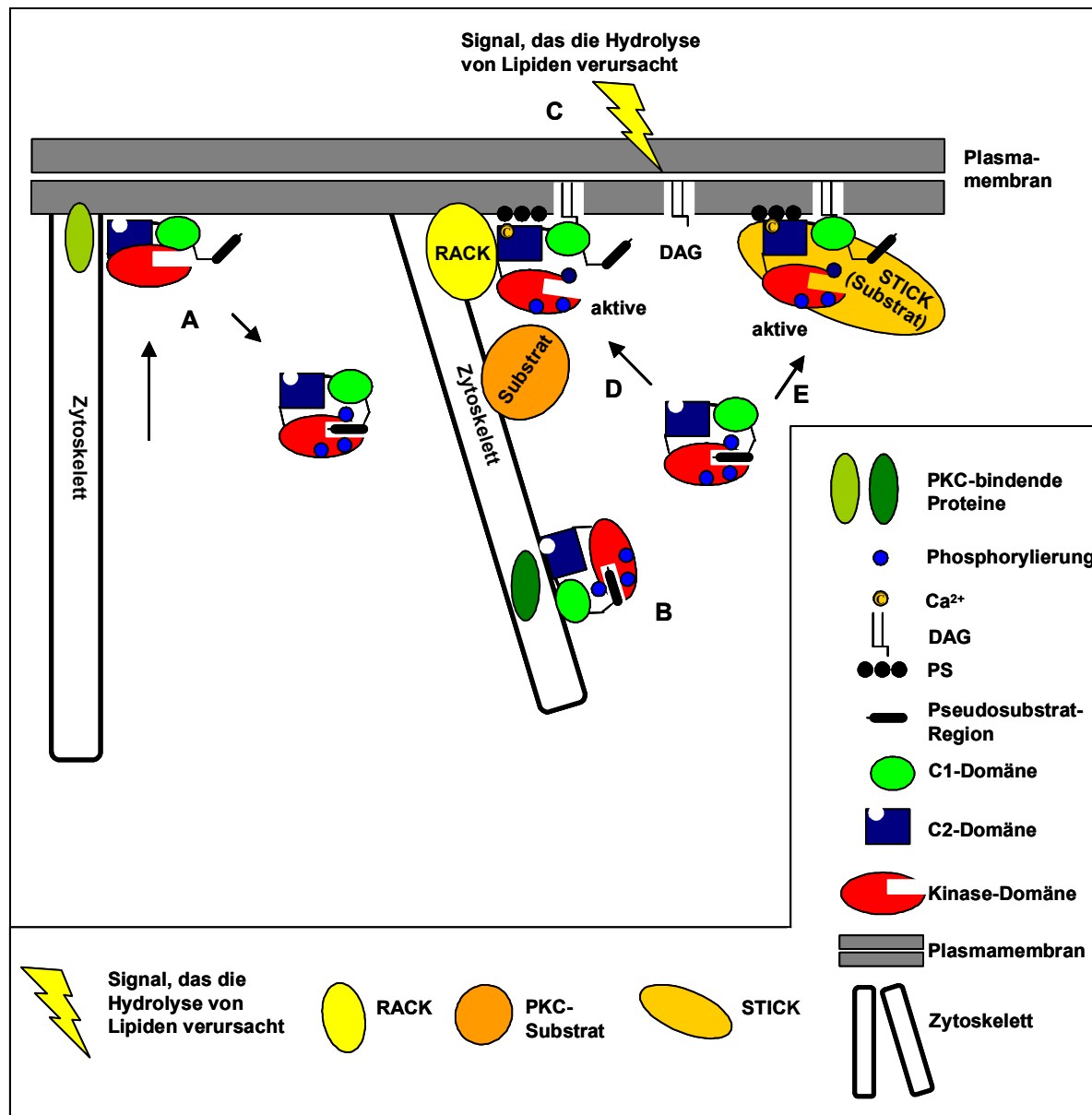
Auf dem Feld der PKC-Protein-Wechselwirkungen ist vieles bis heute ungeklärt, nicht zuletzt weil die Gruppe der PKC-interagierenden Proteine groß und heterogen ist. Zwar lassen sich PKC-Bindungspartner zum Teil in Subgruppen aufteilen: STICKs (substrates that interact with C-kinase) sind PKC-Interaktionspartner, die PKC Phospholipid-abhängig binden, durch PKC phosphoryliert werden und in verschiedenen subzellulären Kompartimenten immer an der Schnittstelle zwischen Membranen und zytoskelettären Strukturen zu finden sind. RACKs (receptors for activated C-kinase) sind keine PKC-Substrate, binden aber PKCs ebenfalls Phospholipid-abhängig. Doch betrachtet man die bisher gefundenen PKC-Interaktionspartner insgesamt, lassen sich viele nicht ohne weiteres in Kategorien erfassen (Jaken und Parker, 2000).

Ein weiterer Aspekt der PKC-Regulation, der ebenfalls in dem eingangs beschriebenen Aktivierungsmodell unberücksichtigt ist, erschwert zudem noch ein umfassendes Verständnis der PKC-Regulation durch Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dieser unberücksichtigte Faktor

ist die Regulation der PKC-Aktivität durch Phosphorylierung. Einen ersten Hinweis, dass cPKCs auch durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität kontrolliert werden, lieferte die Beobachtung, dass eine durch den Phorbolster TPA induzierte, in der Gelelektrophorese schneller wandernde PKC-Form, inaktiv ist (Borner et al., 1988). Einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass aufgereinigte PKC $\alpha$  durch Phosphatase-Behandlung inaktiviert werden kann (Pears et al., 1992). Schließlich war es möglich zu demonstrieren, dass drei Phosphorylierungen innerhalb der Kinaseuntereinheit mitentscheidend für die Aktivität der PKC sind (Keranen et al., 1995; Tsutakawa et al., 1995). Die Details der Phosphorylierungen sind dabei bis jetzt strittig. In jedem Fall ist es zumindest eine initiale Phosphorylierung durch die Phosphoinositid-abhängige-Kinase (PDK), die das Ausmaß der PKC-Gesamtphosphorylierung kontrolliert. Es folgt zumindest eine Autophosphorylierung (Dempsey et al., 2000; Parekh et al., 2000).

Inwieweit unphosphorylierte oder unterschiedlich stark phosphorylierte PKC an unterschiedliche Protein-Interaktionspartnern bindet, ist nicht klar. Der größte Teil der PKC in unstimulierten Zellen liegt in dreifach phosphorylierter Form vor. Dies spricht für die Annahme, dass die Phosphorylierung mehr ein Teil der PKC Prozessierung ist, als ein Teil der Regulation (Newton, 1997). Es spricht außerdem für die Vermutung, dass es in erster Linie die dreifach-phosphorylierte Form ist, die mit anderen Proteinen interagiert. Allerdings gibt es Daten, die demonstrieren, dass PKC in vivo auch durch Dephosphorylierung kontrolliert werden kann (Lee et al., 1996), was die Frage nach unterschiedlichen Bindungspartnern von unterschiedlich stark phosphorylierten PKCs wieder etwas in den Vordergrund rückt.

Auch wenn die Forschung der letzten 20 Jahre noch nicht zu einem umfassenden Funktions-Modell der PKC geführt hat, so ist heute klar, dass die verschiedenen Isoformen durch ein nuanciertes Zusammenspiel von Phosphorylierungen, allosterischer Kontrolle durch Signalmoleküle und durch Protein-Protein-Wechselwirkungen reguliert werden (Abb. I.5).



**Abb. I.5: PKC-Regulation durch Phosphorylierung, Protein-Protein-Interaktion und Signalmoleküle.** (A) Neu-synthetisierte, nicht aktive PKC wird durch Phosphorylierung an drei Stellen innerhalb der Kinaseuntereinheit in eine latent-aktive Form überführt. Der Phosphorylierung geht eine Rekrutierung an die Membran voraus. Eventuell ist auch eine Interaktion mit Zytoskelett-assoziierten Proteinen für eine korrekte Phosphorylierung nötig. (B) Vermutlich bindet vor allem dreifach-phosphorylierte PKC an Zytoskelett-assoziierte Proteine (C) Ein Signal, das die Hydrolyse von  $\text{PIP}_2$  verursacht, wie in Abb. I.4 beschrieben, führt zu einer Überführung der latent-aktiven Form in eine aktive Form. (D, E) Die Interaktion der verschiedenen PKC-Isoformen mit unterschiedlichen Protein-Wechselwirkungspartnern führt dazu, dass verschiedene Isoformen der Kinase spezifische Funktionen regulieren (Jaken und Parker, 2000; Newton, 1997; Parekh et al., 2000).



## 2.3 PKC und das Zytoskelett

Ein wichtiger Aspekt der PKC-Funktion ist die Regulation der Organisation des Mikrofilamentsystems, der Zelladhäsion und der Zellmigration (Clark und Brugge, 1995; Keenan und Kelleher, 1998). Bis heute wurde eine Interaktion von PKC-Isotypen mit diversen Zytoskelett-assoziierten Proteinen beschrieben. So konnte beispielsweise die Wechselwirkung von PKC $\alpha$  mit Integrinen als essentiell für die gerichtete Migration von Myelom-Zellen nachgewiesen werden (Ng et al., 1999). In diesem Zusammenhang steht auch eine Untersuchung die zeigt, dass die Interaktion von konventionellen PKCs mit Integrinen zumindest teilweise durch Tetraspanine vermittelt wird (Zhang et al., 2001). Relativ gut verstanden ist die Interaktion von PKC $\alpha$  mit dem Proteoglycan Syndecan-4, das selektiv PKC $\alpha$  in fokale Kontakte rekrutiert und dort aktiviert (Oh et al., 1997). Syndecan-4-Oligomere binden zwar an die Kinaseuntereinheit der PKC $\alpha$ , phosphoryliert wird Syndecan-4 aber nicht durch PKC $\alpha$  sondern durch PKC $\delta$  (Murakami et al., 2002). Diese Phosphorylierung inhibiert die Oligomerisierung von Syndecan-4 und damit indirekt die Aktivierung von PKC $\alpha$  (Horowitz und Simons, 1998). Aber die PKC-Interaktionen beschränken sich nicht nur auf membranständige Proteine. Einige PKC-Isotypen interagieren direkt mit filamentösem Aktin (F-Aktin). Für PKC $\beta$ II konnte eine Ko-Lokalisation und In-vitro-Bindung an F-Aktin nachgewiesen werden (Blobe et al., 1996; Goodnight et al., 1995). PKC $\epsilon$  ko-lokalisiert und bindet Aktin nicht nur (Prekeris et al., 1996), sondern kann in vitro auch durch die Aktin-Bindung aktiviert werden (Prekeris et al., 1998).

Der größte Teil der PKC-interagierenden Proteine des Mikrofilamentsystems gehört zu der unter 1.2 beschriebenen Kategorie der STICKs (substrates that interact with C-kinase). Tatsächlich ist ein Charakteristikum von STICKs, wie bereits erwähnt, dass sie an der Schnittstelle zwischen Membranen und zytoskelettären Strukturen zu finden sind. Aktin-bindende und -modulierende Proteine, für die eine Interaktion mit PKC in vitro und zum Teil in vivo beschrieben wurde, sind zum Beispiel Adducin (Matsuoka et al., 1998). Annexin (Hyatt et al., 1994), Ezrin (Ng et al., 2001), MARCKS (Aderem, 1992), Moesin (Pietromonaco et al., 1998), Talin (Turner et al., 1989) und Vinculin (Weekes et al., 1996). Alle genannten Proteine sind, wie für STICKs gefordert, PKC-Substrate und interagieren mit PKC in lipidabhängiger Weise. Die Bedeutung der meisten dieser PKC-Interaktionen ist bis heute nicht bekannt. Ausnahmen bilden hier z.B. Adducin, Ezrin und MARCKS, deren Phosphorylierung die Interaktion mit Bindungspartnern moduliert. Die PKC-Phosphorylierung von Adducin beeinflusst die Wechselwirkung des Proteins mit seinen Bindungspartnern Spectrin und F-Aktin (Matsuoka et al., 2000). In Blutplättchen verursacht die PKC $\alpha$ -Phosphorylierung von

Adducin dessen Dissoziation vom Zytoskelett (Barkalow et al., 2003). Auch die Phosphorylierung Ezrins durch PKC reguliert die Bindung Ezrins an das Zytoskelett (Ng et al., 2001). Relativ gut verstanden ist die Interaktion zwischen PKC und MARCKS. Das „Myristoylated Alanin-Rich C-Kinase Substrate“ (MARCKS) ist ein Protein, welches an die Membran bindet und dort mit verschiedenen Proteinen interagiert. Die MARCKS-Membranbindung wird über eine N-terminale Myristylierung, die in die Membran inseriert, und einen basischen Sequenzbereich, der mit sauren Phospholipiden interagiert, vermittelt. Wird die basische Lipidbindungssequenz durch PKC phosphoryliert, bindet sie nicht mehr an die Membran. Der Myristoylrest alleine reicht als Membranverankerung nicht aus und MARCKS löst sich und gelangt ins Cytoplasma (Aderem, 1992). MARCKS gehört zusammen mit den neuronalen Proteinen GAB43 und CAP23 zu einer Gruppe von Proteinen, die wahrscheinlich für die Zurückhaltung von PIP<sub>2</sub> in sogenannten „rafts“ verantwortlich sind (Laux et al., 2000). Die Phosphorylierung von MARCKS durch PKC würde, nach dieser Theorie, die Freisetzung von PIP<sub>2</sub> aus den „rafts“ induzieren.

### **3 Ziel der Arbeit**

Die grundlegende Bedeutung der PKC für die Organisation von Zell-Matrix-Kontakten ist seit längerer Zeit bekannt, so ist PKC unter anderem an der Umorganisation des Zellskeletts als Antwort auf mechanischen Stress beteiligt (Glogauer et al., 1998). Kenntnisse über die PKC $\alpha$ -Protein-Interaktionen in diesem Zusammenhang sind dagegen bisher nur sehr begrenzt.

Mit Hilfe von Yeast-two-hybrid-Untersuchungen sollten zu Beginn dieser Arbeit PKC $\alpha$ -Interaktionspartner gefunden werden, welche für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts von Bedeutung sind.

Nach der Identifizierung eines interessanten Kandidaten (FLN) im Yeast-two-hybrid-System rückte die Charakterisierung der Interaktion in den Mittelpunkt der Arbeit. Nach einer Bestätigung der Interaktion sollte die Wechselwirkung bezüglich ihrer Bindungs- und Phosphorylierungseigenschaften charakterisiert werden. Potentielle physiologische Funktionen der Interaktion sollten ermittelt werden.

## II Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Chemikalien und Enzyme

Die eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Calbiochem (Bad Soden), Difco (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), ICN (Eschwege), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Enzyme wurden, so nicht anders vermerkt, von den Firmen New England Biolabs (Bad Schwalbach), Life Technologies (Eggenstein), Stratagene (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), PAA Laboratories (Cölbe), Promega (Mannheim), (Panvera, Madison, WI) und Appligene (Heidelberg) bezogen.

Der Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen mittels des Yeast-two-hybrid-Systems wurde mit dem „Matchmaker two-hybrid System“ (Clontech, Heidelberg) durchgeführt.

#### 1.2 Bakterien

Zur Klonierung und Expression rekombinanter Proteine wurden die *Escherichia coli*-Stämme *XL1-blue*, *BL21 (DE3)* und *M15(pREP4)* eingesetzt.

Die Stämme weisen folgende relevante genotypische Merkmale auf:

XL1-blue: supE44 hsdR17 recA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup> F'[proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> LacZΔM15 tn10(tet<sup>r</sup>)] (Bullock et al., 1987)

BL21 (DE3): F<sup>-</sup>, ompT, r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>hsdS gal (λcIts857, ind1, Sam7, nin5, lac UV5-T7 gene 1) (Studier und Moffatt, 1986)

M15(pREP4): NaI<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Thi<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>, (Villarejo und Zabin, 1974)

Zur Anzucht von *E. coli* wurden folgende Medien verwendet:

2 x YT-Vollmedium	LB-Medium (Luria Bertani).
16 g Trypton (Difco)	10g Trypton
10 g Hefeextrakt (Difco)	5 g Hefeextrakt
10 g NaCl	10 g NaCl
auf 1 L mit H <sub>2</sub> O	auf 1 L mit H <sub>2</sub> O

Für die Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium in Abhängigkeit des Vektors mit 30 µg Kanamycin/ml und/oder 150 µg Ampicillin/ml supplementiert. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde dem Medium 1.5% (w/v) Agar-Agar zugegeben

### 1.3 Hefen

Die Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien mittels des Yeast-two-hybrid-Systems („Matchmaker two-hybrid System“, Clontech) wurden mit dem *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm HF7c durchgeführt. Der Stamm weist folgende relevante genotypische Merkmale auf:

HF7c: MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3,112, gal4-542, gal80-538, LYS2::GAL1-HIS3, URA3:: $(\text{GAL4 } 17\text{-mers})_3\text{-CYC1-lacZ}$  (Feilotter et al., 1994)

Als Standardmedium für die Anzucht von Hefezellen wurde YPD-Medium eingesetzt:

10 g Hefeextrakt  
20 g Pepton  
auf 950 ml mit H<sub>2</sub>O  
Zugabe von 50 ml autoklavierter, 40%iger Glucose

Für YPD-Agar-Platten wurde das Medium vor der Zugabe der Glucose mit 2% (w/v) Agar-Agar versetzt.

Alle weiteren Medien für die Versuche des Yeast-two-hybrid-Systems wurden dem Herstellerprotokoll des „Matchmaker two-hybrid System“ entnommen.

## 1.4 Tierische Zellkulturzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgende Zelllinie verwendet:

HeLa            ATCC CCL-2; epithelartige Adenocarcinoma-Zellen, Mensch, Gebärmutter  
(Gossen und Bujard, 1992)

Die Zellen wurden in Zellkulturgefäßen der Firma Nunc (Nunc, Wiesbaden-Biebrich) in *Dubblecco's Modified Eagle Medium*,) supplementiert und mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

- 13,38 g DMEM (PAA Laboratories, Cölbe)
- 1,5 g NaHCO<sub>3</sub>
- 10 ml 0,2M N-Acetyl-L-Alanin-L-Glutamin (PAA Laboratories)
- 100 ml FCS (Life Technologies)
- auf 1 L mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

## 1.5 Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Klonierung von PCR-Produkten der Vektor pCR<sup>®</sup>-blunt (Invitrogen) eingesetzt. Für die transiente Expression von Proteinen in tierischen Zellen wurde der Vektor pcDNA3 (Invitrogen) verwendet. Yeast-two-hybrid-Analysen wurden mittels der Vektoren pGAD-T7, pGBK-T7 und pACTII (Clontech) durchgeführt. Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgte mittels der Vektoren pET28a(+) (Novagen) und pQE30 (Qiagen).

## 1.6 Oligodesoxynukleotide

Für die Konstruktion von Vektoren mit N-terminalem Birkenprofilin-tag (BiPro), das den Nachweis oder die Immunopräzipitation der entsprechenden Proteine mit dem spezifischen Antikörper 4A6 ermöglicht, wurden Oligodesoxynukleotide, die unter Berücksichtigung des Leserasters der cDNA Start- bzw. Stoppkodons enthalten, eingesetzt:

BiPro1: 5'- GCCTCCTTCCCACAGTTTAAGCCTCAGGAAATATAGC -3'

BiPro2: 5'-CTCGAGCTAAATTTCTGAGGCTTAAACTGTGGGAAGGAGGCTGCAG-3'

BiPro3: 5'- AGCTTAATGTCCTTCCCACAGTTTAAGCCTCAGGAAATCCCTGCA -3'

BiPro4: 5'- GGGATTTCTGAGGCTTAAACTGTGGGAAGGACATTA-3'

Das durch diese Oligodesoxynukleotide entstehende DNA-Fragment kodiert für die Aminosäuresequenz NSFPQFKPQEI, die das Epitop des monoklonalen, anti-Birkenprofilin Antikörpers 4A6 (1.7, Tab.1) repräsentiert (Rudiger et al., 1997; Wiedemann et al., 1996).

Die Konstruktion von Expressionsvektoren mit N-terminalem Flag-tag, das die Detektion entsprechender Fusionsproteine durch den monoklonalen anti-Flag Antikörper M2 (Sigma) ermöglicht, erfolgte unter Berücksichtigung des Leserasters mit folgenden Oligodesoxynukleotiden:

FlagNHindIIIU: 5'-AGCTTGGATCCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGC -3'

FlagNBamH1L: 5'-GATCGCTTGTCTGTCGTCGTCCTTGTAGTCCATGGATCCA-3'

KpnFlagBamU: 5'-CTCTAGAATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGG-3'

KpnFlagBamI: 5'-GATCCCTTGTCTGTCGTCGTCCTTGTAGTCCATTCTAGAGGTAC-3'

Die Amplifikation von N- bzw. C-terminalen FLNa-Fragmenten erfolgte, entsprechend der cDNA-Sequenz, mit folgenden Oligodesoxynukleotiden:

NFilAEcoRIU: 5'-GGAATTCATGAGTAGCTCCCACTCTC-3'

R3FilANotIL: 5'-GGCGGCCGCTACTTCACTTCGAAGG-3'

R4FilANotIL: 5'-GGCGGCCGCTAGTCAGCCATGAAGG-3'

R5FilANotIL: 5'-GGCGGCCGCTAATTCACCCTGAAGG-3'

R6FilANotIL: 5'-GGCGGCCGCTACTTGACTCGGATGG-3'

R7FilANotIL: 5'-GGCGGCCGCTATGCCACTGAGAAAG-3'

R8FilANotIL: 5'-GGCGGCCGCTATTCCAGAGGAAAGG-3'

R9FilANotIL: 5'-GGCGGCCGCTAGTGGGCCTTGAATG-3'

R10FilANotIL: 5'-GGCGGCCGCTACTGCAGCTTGCTGG-3'

CFilAXhoIL: 5'-GCTCGAGTCAGGGCACCAACAACGC-3'

R20FilABamHIU: 5'-CGGATCCATGCAGCACGTGCCTGGC-3'

R21FilABamHIU: 5'-CGGATCCATGCTAGGGGAAGGGG-3'

R22FilAEcoRIU: 5'-CGAATTCATGGCTTCTCCGTCTGGCG-3'

R23FilAEcoRIU: 5'-CGAATTCATGCCTGGGCATGGAGGGG-3'

R+24FilAEcoRIU: 5'-CGAATTCATGCCCTTCAAGGCCAAAGTC-3'

R24FilAEcoRIU: 5'-CGAATTCATGGCTGACGCCAGCAAGG -3'

Die Amplifikation von C-terminal und die Konstruktion von N-terminal trunkierten FLNa-Fragmenten erfolgte, entsprechend der cDNA-Sequenz, mit folgenden Oligodesoxynukleotiden:

R22FilA-R24 5'-GCTCGAGTCACTTGCTGGCGTCAGC-3'

R22FilA-R24+ 5'-GCTCGAGTCAGACTTTGGCCTTGAAGGG-3'

BamHflagDrdIU 5'-GATCCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGATTTCTAC-3'

BamHflagDrdIL 5'-AGAATTCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCATG-3'

EcoRIspaceBgIIU 5'-AATTCGGCCAAGCCTGTAACCCGAGTGCCTGCC-3'

EcoRIspaceBgIIL 5'-AGGCACTCGGGTTACAGGCTTGGCCG-3'

BamflagPflU 5'-GATCCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGAATTCATCA-3'

BamflagPflL 5'-ATGAATTCCTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCATG-3'

*Site directed mutagenesis* wurden mit folgenden Oligodesoxynukleotiden durchgeführt:

PKCa(bv)mut1128U 5'-GGAGCTGTACGCCATCAAGATCCTGAAGAAGGACG-3'

PKCa(bv)mut1128L 5'-CGTCCTTCTTCAGGATCTTGATGGCGTACAGCTCC-3'

Die Sequenzierung von FLNa Konstrukten wurde mit folgenden Oligodesoxynukleotiden durchgeführt:

FilA1U 5'-CACGCGCTGGTGCAACGAGCAC-3'

FilA2L 5'-GGAAAGTGGGCCGCTGGTTGTG-3'

FilA3U 5'-GCCTCATCTGGACCCTGATCCTG-3'

FilA4U 5'-GCGCGAGAGGCCATGCAGCAGG-3'

FilA5U 5'-CCAGGAGGAGGCAAAAGTGACCG-3'

FilA6U 5'-GACAGAAGGGCACGGTAGAGCCTCAG-3'

FilA7U 5'-CAAGGGAGAGGAGCGCGTGAAG-3'

FilA8L 5'-CATCACAGGAGCCGTCGCCCTTG-3'

FilA9L 5'-GTTGTCCTTGACCAACGCCTCCAC-3'

FilA10L 5'-GTCATTGCGGATGATGTCTGAAGTC-3'

FilA11L 5'-GTGGTCGATGATGTCCACATCTC-3'

FilA12L 5'-CTCACGGGGCAGGAAGCGCACC-3'

FilA13L 5'-GCTCGGTGGGCACGTAGGACAC-3'  
 FilA14L 5'-GAGCGCGGGCAGCGCGGAGC-3'  
 FilA15L 5'-CTGGCCGCCGTACTTGATGGTG-3'  
 FilA16L 5'-CCTTGCGGTCCTCAAAAGAGATC-3'  
 FilA17L 5'-CTGTGACATAGCACTCCTCCAGG-3'  
 FilA18L 5'-CTCCTGGCAATCCATCTTCACC-3'  
 FilA19L 5'-GTTGTTGCCTGCTTTGCTGCAGTC-3'  
 FilA20U 5'-GCTGCTGGTGGGGGTTTCATGGC-3'

## 1.7 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper sind in den Tabellen II 1 und 2 aufgeführt.

**Tab. II. 1: Eingesetzte Primärantikörper:**

Antikörper	Antigen	Typisierung	Hersteller
4A6	Birkenprofilin	mAK Maus	AG Jockusch
anti-Flag M2	Flag-tag	mAK Maus	Eastman Kodak
anti-Filamin	Filamin	mAK Maus	Sigma
3C1	Filamin	mAK Maus	AG Jockusch
anti-Talin	Talin	mAK Maus	Sigma
anti-PKC $\alpha$	PKC $\alpha$	mAK Maus	UBI

**Tab. II 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper:**

Antikörper	Antigen	Hersteller
anti-Maus-HRP	Maus IgG	Dianova/Sigma
anti-Maus-AP	Maus IgG	Dianova/Sigma



## 1.8 Tierische Organe und Gewebe

Grundsätzlich wurde für die Protein-Präparation mit Gewebe aus frisch geschlachteten Tieren gearbeitet. Filamin (FLN) wurde aus Putenmägen isoliert, die nach Abtrennung von Fett- und Bindegewebe und anschließender Homogenisierung bei -80°C gelagert wurden.

## 1.9 Geräte

UV-VIS Spektrophotometer UV 1202, Shimadzu, Duisburg  
Kühlzentrifuge J2-MC, Beckmann, München  
Kühlzentrifuge 3K15, Sigma, Osterode am Harz  
Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus, Hanau  
Tischzentrifuge 113, Sigma, Osterode am Harz  
Peltier Thermal Cycler PTC 200, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA  
ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt  
Geldokumentationsanlage incl. Software E.A.S.Y. RH, Herolab GmbH, Wiesloch  
Video Copy Prozessor P68E, Mitsubishi Electric Cooperation  
Transilluminator, Biometra, Göttingen  
Heizblock DRI-Block DB-2A, Techne  
Heizrührer RCTbasic, IKA Labortechnik, Staufen  
Eppendorf Thermomixer 5436, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg  
Vortex Genie 2™, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz  
Agarose Gelelektrophoreseapparatur Nautiko 810, Labortechnik Fröbel, Lindau  
Electrophoresis Power Supply Consort E455 und E734, Labortechnik Fröbel, Lindau  
Rundschüttel-Inkubator, B.Braun, Melsungen  
Fastblot B44, Biometra, Göttingen  
Inkubator Steri-Cult200, Forma Scientific, Ohio, USA  
Inkubator Certomat, Braun, Biotech International  
Cell Disruptor B-12, Branson Sonic Power Co., Danbury, Connecticut, USA  
ELISA-Reader, MRX, Dynatech Lab.

## **2 Methoden**

### **2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.1.1 Anzucht von *E. coli***

Für die Anzucht von *E. coli* wurden 2 bis 10 ml LB-Medium mit Einzelkolonien von einer Agar-Platte beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert (2ml im Kulturröhrchen im Roller, 10 ml im 100 ml Kulturkolben bei 220 rpm im Schüttelinkubator). Größere Kulturen wurden im Verhältnis 1:50 bis 1:100 mit Über-Nacht-Kultur angeimpft und in Kulturkolben des drei bis zehnfachen Volumens im Schüttelinkubator bei 220 rpm und 37°C inkubiert.

#### **2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien**

Die Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterien wird durch eine spezielle Behandlung der Bakterien, wodurch diese „kompetent“ gemacht werden, bewirkt.

Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit einer üN-Kultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes in einem Verhältnis von 1/50 angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600nm} \approx 0,5-0,6$ ) bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 5 min auf Eis gestellt und bei 4°C bei 5000 x g für 5 min abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in eiskaltem TFBI (0.3 M Natriumacetat pH 5.8, 50 mM  $MnCl_2$ , 100 mM NaCl, 10 mM  $CaCl_2$ , 15% Glycerin) resuspendiert, die Suspension 10 min auf Eis inkubiert und wie oben zentrifugiert. Die kompetenten Bakterien wurden in 2 ww eiskaltem TFBII (100 mM MOPS pH 7, 75 mM  $CaCl_2$ , 10mM NaCl, 15% Glycerin) aufgenommen und in Aliquots à 400 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

## 2.1.2 Transformation von Bakterien

Bei der Transformation wurden 200  $\mu\text{L}$  kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und 10-500 ng Plasmid-DNA oder 50% des Ligationsansatzes zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sek, der die Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle unterstützt. Nach Abkühlen des Transformationsansatzes auf Eis für 1 min wurde 0.7 ml LB-Medium zugegeben und 45-60 min bei 37°C inkubiert, um die Expression der Resistenzgene ( $\beta$ -Lactamase, Phosphotransferase etc.) zu ermöglichen. 50 bis 200  $\mu\text{L}$  des Ansatzes wurden auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und bei 37°C üN inkubiert.

## 2.1.3 Plasmidpräparation

### 2.1.3.1 TELT-Methode

Eine 1,5 ml *E. coli*- Übernachtskultur wurde 5 min bei 6000 x g zentrifugiert, das Bakterien-sediment in 150  $\mu\text{L}$  TELT-Puffer (50 mM Tris/Cl pH 7.5, 62.5 mM EDTA pH 8.0, 0.4% Triton X-100, 2.5 M LiCl) resuspendiert und durch Zugabe von 15  $\mu\text{L}$  Lysozym (10 mg/ml) 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurden die Proteine durch Erhitzen auf 95°C für 2 min denaturiert und auf Eis für 5 min abgekühlt. Nach Zentrifugation bei 13000 x g für 8 min wurden die sedimentierten Zellbestandteilen mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und 100  $\mu\text{L}$  Isopropanol zugegeben. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch eine 15minütige Zentrifugation bei 13000 x g. Das DNA-Pellet wurde mit 100  $\mu\text{L}$  70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50  $\mu\text{L}$  TE mit 1  $\mu\text{L}$  RNase A (1 mg/ml) aufgenommen.

### 2.1.3.2 Alkalische Lyse-Methode

1.5 ml *E. coli*-Übernachtskultur wurden bei 6000 x g für 5 min sedimentiert und das Bakterien-sediment in 350  $\mu\text{L}$  P1 (50 mM Tris/Cl, 10 mM EDTA, 100  $\mu\text{g/ml}$  RNase A; pH8.0) resuspendiert. Durch Zugabe von 350  $\mu\text{L}$  P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) und Durchmischen der Suspension durch Invertieren erfolgte die Lyse der Bakterien. Nach Neutralisation durch 350  $\mu\text{L}$  P3 (3 M K-Acetat, pH5.5) erfolgte eine Präzipitation denaturierter Proteine und

genomischer DNA durch Zentrifugation bei 15000 x g für 15 min. Der Überstand wurde erneut für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 0.7 Volumen Isopropanol gefällt und für 30 min bei 15000 x g präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die DNA konnte ohne weitere Aufarbeitung direkt für die Sequenzierung eingesetzt werden.

#### 2.1.3.3 Plasmidpräparation mit *Qiagen Plasmid Kits*

Die Präparation von Plasmid-DNA mit dem *Qiagen Plasmid Kit* (Qiagen, Hilden) wird über eine Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt. Ein spezielles hydrophiles Trägermaterial gewährleistet durch sein Ausschlußvolumen von ca. 100 µm und einer hohen Oberflächendichte von DEAE-Gruppen eine Trennung der Plasmid-DNA von Proteinen und Polysacchariden.

Die Durchführung der Plasmidpräparation erfolgte nach den Angaben des „Qiagen Plasmid Handbook“.

#### 2.1.4 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und der Grad der Verunreinigung durch Proteine wurde spektrophotometrisch durchgeführt.

Dabei wurde die Absorption der Nukleinsäure-Lösung gegen Wasser bei 260 nm (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml; für ssDNA und RNA 40 µg/ml. Der Grad der Verunreinigung wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorption der Peptidbindung und Phenol) bestimmt. Der Quotient  $oD_{260nm}/oD_{280nm}$  sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen; durch Verunreinigungen wird der Quotient zu kleineren Werten verschoben.

### 2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente werden gemäß ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Dazu wurden entsprechend der zu erwartenden Länge der DNA-Fragmente, Agarosegele unterschiedlicher Konzentration in TBE (89 mM Tris/Cl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden mittels des interkalierenden und fluoreszierenden Ethidiumbromids, das dem Gel direkt zugesetzt wurde, unter UV-Licht nachgewiesen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120V.

### 2.1.6 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Mittels  $Mg^{2+}$ -abhängiger Restriktionsendonukleasen des Typs II können DNA-Fragmente an spezifischen, palindromischen Sequenzen gespalten werden. Dabei werden Phosphodiesterbrücken der Nukleinsäuren hydrolysiert, wobei in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms entweder *sticky* oder *blunt ends* entstehen. Die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Pufferzusammensetzung, Inkubationszeit) wurden je nach Enzym entsprechend den Vorschriften des Herstellers eingestellt.

### 2.1.7 Alkohol-Präzipitation von DNA

Zur Konzentrierung von DNA-Lösungen wurden diese mit Alkohol (100% Ethanol oder Isopropanol) und monovalenten Kationen (in Form von Na-Acetat) versetzt. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Aggregation der DNA-Moleküle und ihrer Präzipitation als Natriumsalz; wogegen kurze DNA-Fragmente in Lösung bleiben.

Die DNA-Lösung wurde mit einem 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat (pH5.4) und 2.5 Vol. 100% Ethanol oder 0.7 Vol. Isopropanol (-20°C) versetzt, durchmischt und 1h bei -80°C gefällt. Durch Zentrifugation bei 13000 x g wurde die DNA sedimentiert und das Präzipitat mit 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 13000 x g) wurde das Sediment in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.1.8 DNA-Fragment-Isolierung

Die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente aus präparativen Agarosegelen erfolgte durch die Bindung der negativ geladenen DNA an Glaspulver und anschließender Elution. Dazu wurde der „QIA<sup>®</sup>EXII Gel Extraction Kit“ (Qiagen) eingesetzt. Das zu isolierende DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel geschnitten und entsprechend den Herstellerangaben behandelt.

### 2.1.9 *In vitro* -Neukombination von DNA-Fragmenten

Durch DNA-Ligasen wird die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen zwei DNA-Fragmenten katalysiert. Als Cofaktoren werden bei eukaryotischen DNA-Ligasen ATP, bei prokaryotischen NAD zur Ausbildung einer kovalente Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-OH-Gruppe benötigt.

Die Ligation wurde in 15µL-Ansätzen durchgeführt (1.5 µL 10 x Appligene-Ligase-Puffer, 2.5 U T4-DNA-Ligase, Insert und Vektor in einem Verhältnis von ca. 3:1) und über Nacht bei 15°C oder bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Behandlung für die Transformation von Bakterien eingesetzt.

### 2.1.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird eine exponentielle Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase durch zyklische Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und DNA-Synthese erreicht. Durch das exponentielle Ansteigen der DNA-Menge erhält man selbst aus geringen Mengen Ausgangsmaterial eine quantitative Menge der gewünschten DNA-Sequenz. Durch Einführung von Erkennungssequenzen verschiedener Restriktionsenzyme bietet diese Methode die Möglichkeit, spezifische cDNA-Bereiche zu amplifizieren und in definierter Orientierung zu klonieren. Für analytische Zwecke wurde die Taq-DNA-Polymerase (Takara, Appligene) aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt, die über keine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität verfügt und entsprechend eine erhöhte Fehlerrate während der Synthese aufweist. Wurde auf eine geringere Fehlerrate Wert gelegt, erfolgte die Amplifikation mit der Tli-DNA-Polymerase (Promega), die über eine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität verfügt.

Die Qualität der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft und die entsprechende Bande quantitativ durch eine Fragment-Isolierung präpariert.

### 2.1.11 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Fragmente wurden zur Subklonierung in einen speziellen Vektor (pCRblunt), der eine hohe Effizienz für rekombinante Klone gewährleisten, inseriert. Die Ligation und Transformation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

Durch die Ligation von *blunt end* PCR-Fragmenten in den linearisierten pCR<sup>®</sup> blunt Vektor wird das letale *E. coli* Gen *ccdB* zerstört, so dass nur rekombinante Klone nach der Transformation wachsen können.

### 2.1.12 Ortsspezifische Mutagenese

Für die gezielte Mutagenese bestimmter Aminosäuren wurde der *QuikChange<sup>TM</sup> site-directed mutagenesis kit* (Stratagene) eingesetzt. Dieser ermöglicht über entsprechende Oligodesoxynukleotide, die die gewünschte Mutation enthalten, mittels PCR einen ortsgerichteten Nukleotidaustausch in der cDNA. Durch einen anschließenden *DpnI* Verdau kann die parentale, methylierte Plasmid-DNA spezifisch verdaut werden, so dass für die Transformation ausschließlich neu synthetisierte, nicht methylierte DNA eingesetzt wird. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

### 2.1.13 Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung

Nichtradioaktive DNA-Sequenzierung wurde mit dem *AmpliTa<sup>®</sup> FS BigDye Terminator Kit* der Firma PE AppliedBiosystems gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion beruht auf dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977), bei dem der zu sequenzierende DNA-Strang mittels einer DNA-Polymerase vom 3'-Ende eines Sequenzierungsoligodesoxynukleotids kopiert wird. Durch die im Reaktionsansatz vorhandene, fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide wird die DNA-Synthese basenspezifisch terminiert.

Für die PCR-Sequenzreaktion wurden 5pmol Sequenzierungsprimer, 0.3µg dsDNS und 2µl Premix in einem Gesamtvolumen von 10µl eingesetzt. Nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide wurden durch Ethanolpräzipitation entfernt, das getrocknete DNA-

Sediment in 13 µl TSR (Template Supression Reagent, PE Applied Biosystems) aufgenommen und für 2 min bei 90 °C denaturiert.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillarelektrophorese mit dem ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer nach Herstellerangaben

#### 2.1.14 Yeast-two-hybrid-System

Das Yeast-two-hybrid-System ermöglicht eine in vivo Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Hefezellen. Dieser Assay nutzt die Möglichkeit der räumlichen Trennung von DNA-bindender und transkriptionsaktivierender Domäne vieler eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. Während die DNA-bindende Domäne die Bindung des Transkriptionsfaktors an stromaufwärts von dem entsprechenden Transkriptionsstartpunkt gelegene regulatorische DNA-Sequenzen ermöglicht, sind transkriptionsaktivierende Domänen für die Initiation der Transkription erforderlich. Da die funktionellen Eigenschaften auch bei einer physikalischen Trennung der beiden Domänen erhalten bleiben, lassen sich Interaktionen von Proteinen über die Rekonstitution des Transkriptionsfaktors nachweisen.

##### 2.1.14.1 Herstellung kompetenter *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter Hefezellen wurden Schüttelkulturen der Hefestämme über Nacht bei 30 °C und 240 rpm in YPD/Ampicillin-Medium gezogen, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 bis 0,4 verdünnt und für weitere 3 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Hefesuspension wurde zentrifugiert, das Sediment mit Wasser gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 1,5 ml aus Stammlösungen frisch angesetztem, sterilen 1 x TE/LiAc pro 300 ml Ausgangskultur resuspendiert (10 x TE: 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA; 10 x LiAc: 1 M Lithiumacetat, pH 7,5). Die Kompetenz der Hefezellen blieb für bis zu 3 Stunden bei RT erhalten.



#### 2.1.14.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation oder Cotransformation der HF7c-Zellen wurden 0,5 bis 1 mg der cDNA-Plasmidbank und/oder 0,5 bis 0,6 mg des Zielplasmids und 0,1 bis 1,5 mg Heringssperma-DNA (10 mg Heringssperma-DNA von Sigma wurden in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>steril</sub> gesöst, durch Ultraschall fragmentiert und durch Erhitzen bei 100 °C für 90 sek in Einzelstrang DNA aufgeschmolzen) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Pro Ansatz wurden 0,1 bis 1,5 ml kompetente Hefezellen und 600 µl aus Stammlösungen frisch angesetzter, steriler PEG/LiAc-Lösung (Endkonzentration: 40% PEG 4000, 1 x TE, 1 x LiAc, aus Stammlösungen: 50% PEG 4000 in H<sub>2</sub>O, 10 x TE, 10 x LiAc) zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C und 200 rpm wurden 70 µl DMSO zugefügt. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 min, gefolgt von einer Abkühlung auf Eis. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert (10 sek bei 14000 x g), der Überstand abgesaugt und das Sediment in 250 µl 1 x TE resuspendiert. Zur Selektion der transformierten Hefeklonen wurde der Transformationsansatz auf Leucin- und/oder Tryptophan-SD-Mangel-Platten verteilt und für 3 bis 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Nur Klone, die erfolgreich mit dem bzw. den Plasmide(n) transformiert wurden, waren in der Lage auf den SD-Mangel-Platten zu wachsen, da sie durch die Plasmide befähigt wurden, ihren Auxotrophiemangel zu kompensieren.

#### 2.1.14.3 $\beta$ -Galaktosidase-Filterassay

Wenn das in den Hefen exprimierte Aktivierungsdomänen-Fusionsprotein mit dem DNA-Bindungsdomänen-Fusionsprotein interagiert, kommt es zur Wiederherstellung eines funktionellen Transkriptionsaktivators und die Expression des lacZ-Reportergens wird aktiviert. Die Aktivität des gebildeten Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase wird in einem Filter-Assay nachgewiesen, bei dem sich die Kolonien, die das Enzym enthalten, durch den Umsatz von X-Gal blau färben.

Die auf Platten gewachsenen Hefezellen werden auf ein Whatman-Filterpapier übertragen und ihre Zellwände durch kurzzeitiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Die derart behandelten Filter werden auf Z-Puffer/X-Gal-getränkten Filterpapieren aufgebracht (Z-Puffer/X-Gal: 100 ml Z-Puffer, 0,27 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1,67 ml X-Gal-Stammlösung; Z-Puffer: 16,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O auf 1 L H<sub>2</sub>O, ca. pH 7; X-Gal Stammlösung: 20 mg X-Gal auf 1 ml N,N-Dimethylformamid) und für bis zu 8 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Eine Blaufärbung der Klone nach 1 bis 8 Stunden zeigt eine Interaktion zweier Proteine im Yeast-two-hybrid-System an. Eine spätere Blaufärbung von Klonen wurde nicht als positive Interaktion bewertet.

## 2.2 Biochemische Methoden

### 2.2.1 Präparation von Putenmagen-Filamin

Putenmagen wurde direkt nach dem Schlachten auf Eis gelagert. Der Muskel wurde von Fett- und Bindegewebe befreit und durch einen Fleischwolf gedreht. Das so vorbehandelte Material wurde portioniert und bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Jeweils 100 g Muskelmasse wurden, ggf. nach langsamen Auftauen über Nacht bei 4 °C, mit 10 Volumenteilen (1 L) 0,5 mM PMSF-Lösung versetzt und 3 x 10 sek im Warring-Blender bei Stufe II homogenisiert. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 8000 rpm und 4 °C für 15 min. Der erhaltene Bodensatz wurde in 1 L PMSF-Lösung resuspendiert, erneut wie oben beschrieben, homogenisiert und zentrifugiert. Der Bodensatz wurde dann in 1 L Puffer A (2 mM Tris, Cl, pH 9 1 mM EGTA; 0,5 mM PMSF, 0,2 mM DTE - frisch angesetzt und auf 37 °C erwärmt) resuspendiert und für 30 min bei 37 °C unter vorsichtigem Rühren extrahiert. Das Extrakt wurde erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 0,5 M Essigsäure auf pH 7,0 eingestellt und dann mit 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung auf 10 mM MgCl<sub>2</sub> eingestellt. Nach 15minütigem Rühren bei RT wurde wieder, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis gestellt und nach Abkühlung langsam, unter rühren, festes Ammoniumsulfat (20,5 g pro 100 ml Überstand) zugegeben. Das Rühren des Überstandes auf Eis wurde für 1 Stunde fortgesetzt und anschließend ein letztes mal, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Der Bodensatz wurde in 15 bis 20 ml Puffer B (20 mM Tris, pH7,6; 20 mM NaCl; 0,1 mM EGTA; 0,2 Mm DTE) eluiert. Die erhaltene Lösung wurde über Nacht bei 4 °C gegen Puffer B dialysiert und anschließend bei RT auf eine Q-Sepharose Säule (Pharmacia) aufgetragen. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit Puffer B gespült bis etwa eine OD<sub>280</sub> von 0 erreicht war. Zur Elution wurde ein linearer NaCl-Gradient von 0 bis 370 mM angelegt. Das Eluat wurde in Fraktionen von 4 ml gesammelt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Wenn die Filamin-haltigen Proben noch nicht ausreichend frei von anderen Proteinen waren ( $\alpha$ -Aktinin und Talin), wurde die oben beschriebene Aufreinigung mit einer MonoQ-Säule wiederholt,

wobei die Steilheit des NaCl-Gradienten jeweils variiert wurde. Gelegentlich war die Probe dann immer noch nicht frei von Talin. In diesen Fällen wurde noch eine Nachreinigung mittels Gelfiltration mit einer Superdex 200 Säule (Pharmacia), nachgeschoben. Die Gelfiltration wurde in Puffer B durchgeführt, bei dessen Salzkonzentrationen Talin kompakter gefaltet vorliegt und sich dadurch von Filamin trennen lässt, obwohl die beiden Proteine sich in ihren Molekulargewichten nicht sehr stark unterscheiden.

### 2.2.2 Expression in *E. coli* und Zellschnellaufschluss

Die für die Expression rekombinanter Proteine verantwortlichen Promotoren der Vektoren pQE30 und pET28b(+) (Qiagen, Hilden) sind durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induzierbar. Dies führt zur Transkription und somit zur Translation eines „downstream“ liegenden, Protein-kodierenden DNA-Fragments.

Nach Induktion der Transkription wurde eine Expressionskinetik erstellt. Die dafür entnommenen Proben wurden entsprechend ihrer optischen Dichte bei 600 nm nach Zentrifugation mit SDS-Probenpuffer versetzt ( $OD_{600} = 1 \propto 0,1 \text{ ml Probenpuffer}$ ) und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.2.3 Expression und Reinigung von rekombinanten human FLNa, FLNb und FLNc Fragmenten mit His-Tag

Die Aufreinigung von hFLNa, hFLNb, und hFLNc Fragmenten erfolgte durch Affinitätschromatographie, basierend auf der hohen Affinität des aus sechs aufeinander folgenden Histidinen bestehenden His-tags an  $Ni^{2+}$ -Ionen. Die Reinigung wurde in Anlehnung an das Herstellerprotokoll („The QIAexpressionist“, Qiagen) durchgeführt.

Die *E. coli* Stämme M15 (pREP4) und BL21 wurden mit den entsprechenden Konstrukten transformiert. Die Bakterien wurden in 2 x YT Medium unter entsprechendem Selektionsdruck bei 37°C kultiviert und die Proteinexpression bei einer  $OD_{600nm}$  von 1 durch IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach 3 h wurden die Bakterien bei 6500 x g sedimentiert, in 25 ml kaltem Lysispuffer (50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 14 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 50  $\mu$ M Pefabloc SC, 0.46  $\mu$ M Aprotinin; pH 8.0) pro Liter Ausgangskultur resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Alternativ wurden einige Fragmente über 24 h bei RT angeschüttelt. In diesen Fällen wurde IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mM direkt am Anfang zugegeben. Des Weiteren wurde mit diesen Fragmenten wie oben

beschrieben verfahren. Nach dem Auftauen bei 4 °C wurden die Bakterien durch Ultraschallbehandlung auf Eis (3 x 45 sek, 80 W) vollständig aufgeschlossen und Zelltrümmer bei 30 000 x g bei 4°C für 30 min sedimentiert.

Der Überstand wurde mit in Lysispuffer äquilibrierter Ni-NTA-Sepharose für 1 h auf Eis inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden im Batchverfahren nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Eluiertes Protein wurde auf seine Reinheit durch SDS-PAGE überprüft, entsprechende Fraktionen vereinigt und durch Dialyse umgepuffert.

## 2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode nach Bradford (1976) basiert auf der Reaktion der Proteine mit Coomassie Blau, die über einen großen Konzentrationsbereich linear zur eingesetzten Proteinmenge ist. Dabei entstehende Farbstoffkomplexe weisen ein Absorptionsmaximum bei 595 nm auf (Bradford, 1976).

20 µl Proteinlösung wurden in einer 96-Loch Platte mit 100 µl Bradford-Reagenz (Sigma) versetzt und nach 15minütiger Inkubation bei 595 nm photometrisch mittels eines „ELISA-Readers“ vermessen. Die Proteinkonzentration wurde in Abhängigkeit einer Eichgeraden mit BSA (10 – 100µg/ml) bestimmt.

### 2.2.4.2 Proteinbestimmung über molare Extinktionskoeffizienten

Mittels molarer Extinktionskoeffizienten kann die Proteinkonzentration über das Lambert-Beersche-Gesetz ermittelt werden:

$$E = \epsilon \cdot d \cdot c$$

E: Extinktion bei 280 nm       $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient

d: Schichtdicke      c: Konzentration

Die Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe des Programms DNASTAR Protean™ errechnet.

### 2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dafür wurde das Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelsystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) eingesetzt. Die Proben wurden mit 5 x Probenpuffer (375 mM Tris/HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 12% (v/v) Glycerin, 1.4 M  $\beta$ -Mercaptoethanol, Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Entsprechend der Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine wurden diskontinuierliche Gele unterschiedlicher Polyacrylamid-Konzentration verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (25 mA/Gel). Anschließend wurden die Gele entweder fixiert und gefärbt (15% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0.025% (w/v) Coomassie Blau) und danach zur Verdeutlichung der Proteinbanden entfärbt (15% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure) oder für einen Immunblot (siehe 2.2.6) entsprechend weiterbehandelt. Als Größenstandards dienten die in Tabelle 4 aufgeführten „low molecular weight marker“ (LMW, Sigma), „high molecular weight marker“ (HMW, Sigma) oder „prestained marker“ der Firma NEB.

**Tab. II 4: Molekulargewichtszusammensetzung der eingesetzten Marker**

LMW (in kDa)	
Rinderalbumin	66
Ovalbumin	45
GAPDH	36
Carboanhydrase	29
Trypsinogen	24
Trypsin-Inhibitor	20.1
$\alpha$ -Lactalbumin	14.2

HMW (in kDa)	
Myosin	205
$\beta$ -Galactosidase	116
Phosphorylase-B	97.5
Rinderalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase	29

prestained marker (in kDa)	
MBP- $\beta$ -Galactosidase	175
MBP-Paramyosin	83
Glutamatdehydrogenase	62
Aldolase	47.5
Triosephosphat Isomerase	32.5
$\beta$ -Lactoglobulin A	25
Lysozym	16.5
Aprotinin	6.5

### 2.2.6 Immunblot

Um Proteine spezifisch nachzuweisen, wurde der Immunblot (Westernblot) eingesetzt. Dabei werden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine durch Anlegen einer Spannung elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte analog den Herstellerangaben (Biometra). Freie Bindungsstelle der Nitrozellulosemembran wurden durch Inkubation für 1 h bei RT oder üN bei 4°C mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST (20 mM Tris/HCl, pH 7,6, 140 mM NaCl, 0,02% Tween-20) abgesättigt. Nach Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem ersten Antikörper in 2% (w/v) BSA in TBST für 1h bei RT inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit TBST entfernt, bevor der gegen den ersten Antikörper gerichtete Sekundär-Antikörper (Meerrettichperoxidasegekoppelt) in 2% (w/v) BSA in TBST für 30-45 min bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper und anschließendem Waschen mit TBST + 1% Triton-X-100 erfolgte die Blotentwicklung.

Der mit HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurden durch Chemilumineszenzreaktion detektiert. Dazu wurde der Blot mittels des *enhanced chemoluminescence*- (ECL) oder des empfindlicheren Super-ECL-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech entwickelt. Dabei wird mit Hilfe der Peroxidase unter Lichtemission Luminol oxidiert. Das Licht wurde mittels Röntgenfilm (Kodak X-Omat, Amersham Pharmacia Biotech) nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.2.7 *In vitro* Transkription und Translation zur radioaktiven Markierung von Polypeptiden

Zur Expression radioaktiv markierter Polypeptide wurde das gekoppelte *in vitro* Transkriptions/Translationssystem der Firma Promega verwendet (TNT<sup>®</sup>Quick Coupled Transcription/Translation System). Dabei bindet die T7-RNA-Polymerase den T7-Promotor entsprechender Expressionsvektoren und transkribiert die klonierte cDNA. Die resultierende RNA wird im Retikulozyten-Lysat translatiert, wobei dem methioninfreien Aminosäuremix [<sup>35</sup>S]-Methionin beigelegt wird. Die Reaktion wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Zur Überprüfung der Reaktion wurden 1 – 2 µl der Translationsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und in einem Autoradiogramm analysiert.

### 2.2.8 *Dot overlay* Assay

Intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen können im *dot overlay* Assay nachgewiesen werden. 5–25 pmol einer Proteinelösung wurden mittels eines Vakuum-Spotters (Biometra) auf Nitrozellulose aufgebracht, der Transfer durch Ponceaurot-Färbung überprüft und freie Bindungsstellen der Membran mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST bei RT für 1 h abgesättigt. Nach Waschen mit PBS wurde die Membran mit 20 µl *in vitro* translatiertem, radioaktivem Protein in 1.5 ml Overlay-Puffer (TBST, 14 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und Proteaseinhibitoren) für 3 h bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Overlay-Puffer wurde die Membran getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert.

### 2.2.9 Phosphorylierung von FLN durch die Proteinkinase C $\alpha$ (PKC $\alpha$ )

Aufgereinigtes FLN wurde mit PKC $\alpha$  weitgehend unter Anwendung des von Marais und Parker (Marais und Parker, 1989) beschriebenen „mixed micelle assay“ phosphoryliert. Dabei wurden die jeweils gewünschten Mengen an FLN in 25 oder 50 µl-Ansätzen zusammen mit 0,1 mM ATP, 0,1 µCi [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP (4500 Ci/mmol), 0,63 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 M 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), 120 µM Phosphatidylserin und 30 ng rekombinanter PKC $\alpha$  in Kinase-Puffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EGTA und 0,25% Triton X-100) bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde zu den jeweils angegebenen Zeiten durch Zugabe von Probenpuffer gestoppt. Phosphoryliertes Protein wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann entweder auf Nitrocellulose (NC) Membranen geblottet oder aber die Gele wurden nach Coomassie-Färbung getrocknet. Der  $^{32}$ P-Einbau wurde entweder mittels Autoradiographie oder mit Hilfe eines Phosphorimagers (Fuji BAS-2500) analysiert.

### 2.2.10 Phosphorylierung mittels der cAMP-abhängigen Serin/Threonin Proteinkinase (PKA)

Die Untersuchung der Phosphorylierung von FLN-Fragmenten durch die cAMP-abhängige Serin/Threonin Proteinkinase (PKA) wurde stets unter Verwendung der katalytischen Domäne der PKA durchgeführt. Der Vorteil ist hier, dass eine Aktivierung über cAMP nicht notwendig ist. Die gewünschten Mengen an FLN-Fragment wurden in 25 oder 50 µl Ansätzen zusammen mit 0,1 mM ATP, 0,1 µCi [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP (4500 Ci/mmol), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,2 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,4 und 200 ng PKA (katalytische Domäne) inkubiert. Mit dem phosphorylierten Protein wurde im Folgenden so verfahren, wie es unter 2.2.9 für das durch PKC $\alpha$  phosphorylierte FLN beschrieben ist.

### 2.2.11 Saccharose-Lipidvesikel (SLV) Pulldown

Zur Untersuchung von Lipid-Protein Interaktionen wurde als Methode der Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown gewählt. Bei dieser Methode werden große einlamellige Vesikel (LUVETs) mit der jeweils gewünschten Phospholipid-Zusammensetzung hergestellt. Da sie in Saccharose-haltigem Puffer hergestellt und später in Saccharose-freiem Puffer eingewaschen werden, können die Vesikel, die immer noch „schweren“ Saccharose-haltigen Puffer umschließen, durch Zentrifugation mit relativ niedrigen g-Werten präzipitiert werden. Werden die Vesikel vor der Zentrifugation mit Proteinen inkubiert, ko-sedimentieren sie die Proteine, wenn diese an die Vesikel binden.

LUVETs werden hergestellt, indem zunächst die gewünschten Mengen an Lipiden zusammen gegeben werden; z.B. 0,72 mg PC, 0,72 mg PS und 0,16 mg PIP<sub>2</sub> (dies entspricht einer späteren Lipidzusammensetzung von 9 : 9 : 2 für PC, PS und PIP<sub>2</sub>, wie sie für die Bindungsstudien gewünscht wurde). Die in Methanol/Chloroform gelösten Phospholipide wurden dann mit einem N<sub>2</sub>-Gasstrom eingetrocknet und anschließend in SLV-Puffer I (600 mM Saccharose, 100 mM NaCl, 40 mM Tris, pH 7,5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) gelöst, dass die Lipidkonzentration 2 mg/ml beträgt. Das Lösen geschieht durch starkes Schütteln auf einem Vortexer nicht unter 1 h. Nach dieser Prozedur hat man ein Gemisch von Vesikeln verschiedener Größe, einlamellig und viellamellig. Um nun ausschließlich große, einlamellige



Vesikel herzustellen, wird das Lipidgemisch mindestens 5-mal eingefroren und wieder aufgetaut. Durch den Phasenübergang beim Einfrieren und Auftauen bringt man Lipidvesikel dazu, miteinander zu „verschmelzen“; ein Prozess der geeignet ist, große einlamellige Vesikel zu produzieren.

Die Lipidvesikel in SLV-PufferI werden dann 1:5 mit SLV-PufferII (wie SLV-PufferI, ohne Saccharose) gemischt und für 30 min bei 100.000 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Vesikel werden dann in 2 bis 4 Volumen (relativ zum Ausgangsvolumen) SLV-PufferII aufgenommen, durch 15minütiges zentrifugieren bei 15.000 x g erneut sedimentiert und schlussendlich so in SLV-PufferII aufgenommen, dass die Lipidkonzentration 1 mg pro ml beträgt.

Jeweils 100 pmol der zu untersuchenden Proteine, in 40 µl SLV-PufferII, werden mit jeweils 40 µl der hergestellten Phospholipidvesikel für 15 min bei 37 °C geschüttelt und anschließend für 15 min bei 15.000 x g sedimentiert. Der Überstand wird abgenommen und mit Chloroform/Methanol gefällt. Das gefällte Protein, ebenso wie das Lipidsediment, wird in Probenpuffer aufgenommen und für 5 min aufgekocht. Die Verteilung des Proteins auf Überstand und Sediment wird durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

### 2.2.12 Kinase Assay/ Saccharose-Lipidvesikel (SLV) Pulldown

Um den Einfluß der PKC $\alpha$  Phosphorylierung auf die FLNa Phospholipidbindung zu untersuchen, wurde das Deletionsfragment FLNa-22-24C vor der Durchführung des unter 2.2.11 beschriebenen Assays mit PKC $\alpha$  phosphoryliert. Da PS-Micellen für die Aktivierung der PKC $\alpha$  notwendig sind, diese aber die Lipidbindungsversuchen stören, wurde das Protein nach der Phosphorylierung mit PKC $\alpha$  (2.2.9) an jeweils 15 µl Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen) gebunden. Die PS-Micellen des Kinase Assays wurden entfernt, indem das Protein, wie im Qiagen-Benutzermanual beschrieben, (siehe auch 2.2.3) auf den Ni-NTA Beads gewaschen und anschließend eluiert wurde. Bevor der SLV-Pulldown, wie unter 2.2.11 beschrieben, durchgeführt wurde, ist das Protein noch in den SLV-PufferII dialysiert worden.

### 2.2.13 Kinase/Dimerisierungs Assay

Zur Analyse des Einflusses der PKC $\alpha$  Phosphorylierung auf die FLN-Dimerisierung wurde eine Kombination aus Kinase Assay und chemischer Quervernetzung (crosslinking) gewählt. Jeweils 100 pmol verschiedener FLN Deletionsfragmente wurden zunächst exakt wie unter 2.2.9 und 2.2.10 beschrieben, mit PKC $\alpha$  oder PKA in Gegenwart von [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP

phosphoryliert. Bei Kontrollansätzen wurde die Kinase weggelassen. Nach 30minütiger Inkubation der Phosphorylierungsreaktion wurden die Kinaseansätze (25 µl) in 200 µl Dimerisierungspuffer so verdünnt, dass als Endkonzentrationen 20 mM HEPES, pH 7,0, 80 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 600 mM KCl vorlagen. Die nun folgende chemische Quervernetzung wurde mit dem Crosslinker DSS (Disuccinimidyl suberate) durchgeführt, welches in DMSO vorverdünnt so konzentriert zugegeben wurde, dass eine DSS-Endkonzentration von 1,3 mM erreicht wurde.

Nach Zugabe des Quervernetzers wurde jeweils für 30 min unter schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion des NHS-Esters DSS mit den primären Aminen der Proteine wurde dadurch gestoppt, dass jeweils der gesamte Ansatz mit Chloroform/Methanol präzipitiert wurde und die entstehenden Proteinsedimente in SDS-Probenpuffer aufgekocht wurden.

Die Mischung aus FLN-Monomeren und vernetzten FLN-Dimeren wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden Commassiegefärbt, getrocknet und anschließend mittels Densitometrie, Autoradiographie und Phosphorimager analysiert.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung von Zellkulturzellen

Die Zellen wurden in Gewebekulturschalen der Firma Nunc (Wiesbaden-Biebrich) in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10% FCS bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### 2.3.2 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS mit einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sich ca. 50-70% der Zellen vom Gefäßboden gelöst hatten. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens DMEM/10% FCS gestoppt, die Zellkonzentration mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellzahl replattiert.

### 2.3.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeit-Konservierung wurden ca.  $10^6$  Zellen/ml nach dem Trypsinisieren in eisgekühltem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO in DMEM) aufgenommen und langsam in Kryoröhrchen (Nunc) auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Die längerfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Rekultivierung wurden die Zellen in einem Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und in Gewebekulturschalen plattiert.

### 2.3.4 Transiente Transfektion von Zellen

#### 2.3.4.1 Calciumphosphat-Methode

Exogene DNA, die an Calciumphosphatkristalle angelagert ist, wird von tierischen Zellen unter geeigneten Pufferbedingungen pinozytotisch aufgenommen. Gelangt transfizierte, exogene DNA in den Zellkern, erfolgt dort unter der Kontrolle eines entsprechenden Promotors die Transkription der eingebrachten cDNA.

Zellen wurden ausgesät und 12-20 h in serumhaltigem Medium inkubiert. 4 h vor der transienten Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Plasmid-DNA wurde mit 20 x  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (2.5M  $\text{CaCl}_2$ ) und tropfenweiser Zugabe von 2 x HEBS-Puffer (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7.1) unter ständigem Mischen präzipitiert. Das Volumen eines Ansatzes richtete sich nach der Größe der eingesetzten Kulturschale und betrug 1/10 des Mediumvolumens. Nach 30 – 60 min wurde das Präzipitat auf die Zellen gegeben und verteilt. Die Zellen wurden nach 16 h Inkubation mit PBS gewaschen, mit frischem Medium versorgt und für weitere 4 - 24h inkubiert, bevor sie für Immunpräzipitationen oder  $[^{32}\text{P}]$  Orthophosphat Markierungen eingesetzt wurden.

#### 2.3.4.2 Transfektion mit FuGene<sup>TM</sup> Transfektionsreagenz

FuGene<sup>TM</sup> Transfektionsreagenz ist ein nicht liposomaler Lipidmix, der eine hohe Transfektionseffizienz ermöglicht. Transiente Transfektionen für ko-Immunpräzipitationen, bei denen eine gleichmäßige und hohe Transfektionsrate wünschenswert war, wurden zum Teil mittels dieses Agens durchgeführt.

$1.5 \times 10^6$  HeLa-Zellen wurden pro 10cm Kulturschalen ausgesät und 12-20 h inkubiert. 2.4  $\mu\text{g}$  DNA pro Konstrukt wurde in 100 $\mu\text{l}$  serumfreiem DMEM mit jeweils 4  $\mu\text{l}$  FuGene<sup>TM</sup>

Transfektionsreagenz für 20-30 min inkubiert und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden weitere 16-24 h inkubiert und anschließend für ko-Immunpräzipitationen eingesetzt.

### 2.3.5 Ko-Immunpräzipitation

Mittels Ko-Immunpräzipitation ist es möglich, Komplexbildung von Proteinen unter physiologischen Bedingungen innerhalb von Zellen nachzuweisen. Um die in-situ-Situation nach Möglichkeit zu bewahren, ist es empfehlenswert, die Zellen vor der eigentlichen Immunpräzipitation mit einem chemischen Quervernetzer (crosslinker) zu behandeln. Der eingesetzte Membran-gängige Cross-linker war Lomant's Reagent (Dithiobis(succinimidyl Propionat), DSP) (Pierce). Die beiden durch einen 12 Ångström Spacer voneinander getrennten reaktiven Gruppen dieses Cross-linkers reagieren mit primären Aminen und vernetzen so über die N-terminalen Amino-Gruppen vor allem über Lysin-Seitenketten Proteine, die in der Zelle in unmittelbarer Nähe (12 Å) voneinander vorliegen.

Die so behandelten Zellen werden lysiert und nach Zentrifugation die Zellüberstände mit Antikörpern gegen endogen oder exogen exprimierte Proteine inkubiert (transiente Transfektion, siehe II.2.3.4). Die Sedimentation der Komplexe aus spezifischem Antikörper, Zielprotein und eventuell kovalent gebundenem Interaktionspartner erfolgt mit einem Immunglobulin-bindenden Trägermaterial. Die so isolierten Proteine werden im Immunblot nachgewiesen.

Zur Analyse intermolekularer Wechselwirkungen unter physiologischen Bedingungen können Proteinkomplexe aus Zellen mittels spezifischer Antikörper immunpräzipitiert werden.

Potentielle Liganden des präzipitierten Proteins können in anschließenden Immunblots spezifisch nachgewiesen und als Komponente dieses zellulären Proteinkomplexes identifiziert werden.

$1.5 \times 10^6$  HeLa Zellen wurden auf 10cm Kulturschalen ausgesät, wie unter 2.3.4 beschrieben, transient transfiziert und weitere 24h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30min mit dem bivalenten, membrangängigen und reduzierbaren *crosslinker* Dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP; 0.5 mM in PBS) bei 37°C inkubiert. Der Crosslinker wurde durch Waschen mit PBS entfernt und freie aktive Gruppen durch 15minütige Inkubation mit 0,2 M Glycin in PBS abgesättigt. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen mit 1 ml RIPA-Puffer auf einer Wippe bei 4°C permeabilisiert.

Anschließend wurden die permeabilisierten Zellen mit einem *cellscraper* abgekratzt, durch Ultraschallbehandlung vollständig aufgeschlossen und Zelltrümmer bei 4°C sedimentiert (13000 x g; 10 min). Um unspezifische Bindung an die Sepharose zu verhindern, wurde der Überstand mit 15 µl einer 1:1 Suspension Protein-G-Sepharose in Blockpuffer (2% BSA in PBS) versetzt, für 1h unter Drehen bei 4°C inkubiert und die Sepharose bei 8000 x g sedimentiert. Für die Immunpräzipitation wurde der Überstand mit dem entsprechenden Antikörper über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert. Zur Ausbildung sedimentierbarer Antikörperkomplexe wurde 40µl der Protein-G-Sepharose Suspension zugegeben und für 1h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze dreimal mit RIPA-Puffer und einmal mit PBS gewaschen und zur Spaltung des *crosslinkers* 10min bei RT in SDS-PAGE-Probenpuffer mit 20%  $\beta$ -Mercaptoethanol inkubiert, für 10min bei 95°C denaturiert und durch SDS-PAGE und Immunblot analysiert.

### 2.3.6 Nachweis von in vivo Phosphorylierung durch Markierung mit [<sup>32</sup>P]Orthophosphat und Immunpräzipitation

Soll herausgefunden werden, ob ein Protein in vivo phosphoryliert vorliegt, kann dies geschehen, in dem die Zellen, in denen die in vivo Phosphorylierung untersucht werden soll, mit [<sup>32</sup>P]Orthophosphat haltigem Medium gehalten werden und die Proteine im Anschluss an diese Behandlung immunpräzipitiert und auf [<sup>32</sup>P]Inkorporation hin untersucht werden.

Sollen im Rahmen solch einer Untersuchung auch Rückschlüsse bezüglich der Kinase gezogen werden, die das Protein in Frage phosphoryliert hat, so kann dies geschehen, wenn die fragliche Kinase spezifisch stimuliert wird.

Im Fall von PKC $\alpha$  ist ein möglicher Stimulator der Phorbolester TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate). Da es sich mittlerweile gezeigt hat, dass TPA weit mehr Proteine stimuliert als noch vor einigen Jahren angenommen wurde, ist es allerdings problematisch, einen TPA Effekt ohne weiteres der PKC $\alpha$  zuzuschreiben. Ein Ausweg ist hier, neben der Stimulation auch mit der Inhibition der PKC $\alpha$  zu arbeiten. Ein in niedrigen Konzentrationen hochspezifischer PKC $\alpha$ -Inhibitor ist Bisindolylmaleimid (BIM).

Um die in vivo Phosphorylierung von FLN zu untersuchen, wurden mit einem C-terminalen FLNa Deletionskonstrukt (FLNa-22-24C) transient transfizierte Hela-Zellen (II.2.3.4) oder untransfizierte Hela-Zellen bis zur Konfluenz gehalten. Die Zellen wurden dann etwa 16 h nach Transfektion oder 40 h nach dem Ausbringen der Zellen, mit Medium ohne FCS gehalten. Nach weiteren 24 h wurde dann zu einem Medium gewechselt, das als einzige Phosphatquelle [<sup>32</sup>P]Orthophosphat beinhaltete. Nach 16 h wurden dann Zellen entweder unbehandelt

gelassen, für 10 min mit TPA stimuliert oder für 20 min mit dem PKC $\alpha$  Inhibitor BIM behandelt und nach weiteren 10 min ebenfalls mit TPA stimuliert. Direkt im Anschluss an diese Behandlung wurden die Zellen, wie unter II.2.3.5 beschrieben, immunpräzipitiert. Bei den transfizierten Zellen wurden die C-terminalen FLNa-Fragmente über ihren Flag-tag mit Hilfe von anti-Flag Antikörper präzipitiert; aus den nicht transfizierten Zellen wurde endogenes FLN mittels zwei verschiedener FLN Antikörper (siehe II.1.7 Tab.1) präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf NC-Membranen geblottet. Die [ $^{32}\text{P}$ ]Inkorporation wurde mit Hilfe eines Phosphorimagers quantifiziert. Die jeweiligen Proteinmengen der einzelnen Banden auf der NC-Membran wurden durch densitometrische Auswertung von Immunblots ermittelt.

### III Ergebnisse

#### ***1 Filamin (FLN) ist ein PKC $\alpha$ -Interaktionspartner im Yeast-two-hybrid-System***

Über Filamin weiß man, dass es durch PKC $\alpha$  in vitro phosphoryliert wird (Kawamoto und Hidaka, 1984). Eine grundlegende Untersuchung einer PKC $\alpha$ -Filamin-Interaktion ist dagegen noch nicht vorgenommen worden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung von Filamin und PKC $\alpha$  untersucht.

Über PKC $\alpha$  ist seit längerem bekannt, dass es in den fokalen Kontakten zu finden ist (Jaken et al., 1989), ferner konnte gezeigt werden, dass aktive PKC in verschiedenen Zelltypen für den Aufbau dieser Strukturen von Bedeutung ist (Woods und Couchman, 1992). Eine detaillierte Vorstellung der PKC $\alpha$ -Interaktionen in diesem Zusammenhang ist allerdings bis heute nicht entwickelt.

Ausgehend von dieser Situation sollten am Beginn dieser Arbeit mittels des Yeast-two-hybrid-Systems PKC $\alpha$ -Liganden identifiziert werden, die auch Komponenten fokaler Kontakte sind. Hierfür wurden im *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm HF7c eine cDNA-Bank 17 Tage alter Mausembryonen und eine humane Herz cDNA-Bank (beide Clontech) durchsucht.

Als Köder wurde eine ATP-bindungsdefiziente PKC $\alpha$ -Mutante (K368M) (Ohno et al., 1990) verwendet (siehe auch 3.3.1). Diese Mutante wurde als Fusionsprotein mit der DNA-bindenden Domäne des GAL4-Transkriptionsaktivators exprimiert. Die von den cDNA-Bänken kodierte Proteine waren mit der transkriptionsaktivierenden Domäne des GAL4-Transkriptionsaktivators fusioniert.

## **1.1 Generierung einer ATP-bindungsdefizienten PKC $\alpha$ -Mutante-(K368M) und Klonierung der mutierten Sequenz in einen Hefe-Expressionsvektor für das Yeast-two-hybrid-System**

Die Funktionalität von Kinasen legt nahe, dass Wechselwirkungen mit Substrat- oder Gerüstproteinen nur transient stattfinden können. Würden Kinasen mit ihren Liganden stabil interagieren, wäre es schwierig für sie, nur kurz an Substratkomplexe zu binden und sich nach dem Anhängen eines Phosphatrestes gleich wieder zu lösen.

Um die Erfolgsaussichten einer Yeast-two-hybrid-Suche zu verbessern, wurde eine ATP-bindungsdefiziente PKC $\alpha$ -Mutante hergestellt. Dies geschah mittels einer gerichteten Mutagenese (Punktmutagenese). Die Aminosäure 368 der Wildtyp-PKC $\alpha$ , ein Lysin, wurde durch ein Methionin ersetzt. Fehlt dieses Lysin in der C3-Domäne der Kinase, kann ATP nicht mehr gebunden werden. Substrat kann zwar noch binden, aber nicht mehr phosphoryliert werden. Der von Ohno und Mitarbeitern beschriebene dominant negative Effekt der K368-Mutation legt nahe, dass die mutierte PKC $\alpha$  stabiler an Substrat-Proteine bindet als der Wildtyp (Ohno et al., 1990). Die K368M-Mutante sollte daher in Yeast-two-hybrid-Versuchen stabilere Kinase-Liganden-Bindungen ausbilden. So sollte es möglich sein, auch schwache Interaktionen zu finden, die mit einer Wildtyp-PKC $\alpha$  als Köder vielleicht nicht gefunden würden.

Nach der Generierung der K368M-Mutante und nach vollständiger Überprüfung der gesamten Sequenz durch Sequenzierung, wurde das veränderte PKC $\alpha$ -Konstrukt in einen Expressionsvektor für das Yeast-two-hybrid-System kloniert. Die Mutagenese war in dem pCR blunt Klonierungsvektor vorgenommen worden. Das Konstrukt besaß bereits vor und hinter der kodierenden Sequenz je eine Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen EcoRI- und XhoI. Diese beiden Enzyme wurden für das Umsetzen der DNA in den Yeast-two-hybrid-Vektor pGBKT7 genutzt. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsverdau und durch Sequenzierung überprüft.



## 1.2 Das PKC $\alpha$ -(K368M)-Yeast-two-hybrid-Fusionsprotein interagiert mit einem bekannten PKC $\alpha$ -Liganden, aber nicht mit einem weiteren Kontrollprotein

Bevor die Yeast-two-hybrid-Versuche mit verschiedenen cDNA-Bänken und dem PKC $\alpha$ -(K368M)-DNA-Bindungsdomänen-Fusionsprotein als Köder durchgeführt wurden, war es sinnvoll das Konstrukt zu testen. Es galt sicherzustellen, dass das Fusionsprotein nicht selbstständig oder aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen die Transkription des Reportergens (lacZ) verursacht. Es wurden daher zunächst verschiedene Kontrollversuche im Yeast-Two-hybrid-System durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tab. III. 1: Test der PKC $\alpha$  Yeast-two-hybrid-Konstrukte**

	pGBKT7	pGBKT7 /PKC (K368M)
pGADT7	-	-
pGADT7 Vinculin Kopf (AS 1-850)	-	+
pGADT7 Vinculin Schwanz	-	+
pACTII VASP	-	-

Minus (-) = keine Interaktion

Plus (+) = Interaktion

Wie in Tabelle 1 aufgeführt, aktivierte das PKC $\alpha$ -(K368M)-DNA-Bindungsdomänen Fusionsprotein im *S. cerevisiae* Stamm HF7c nicht eigenständig das Reportergen für  $\beta$ -Galaktosidase. Es interagiert auch nicht mit dem Aktivierungsdomänen Fusionsanteil des Vektors pGADT7 allein und nicht mit dem Vasodilator-stimulierten-Phosphoprotein (VASP), das hier als weitere Negativkontrolle genutzt wurde. Andererseits interagiert das PKC $\alpha$ -(K368M)-Fusionsprotein mit Vinculin-Deletionsfragmenten – die VASP- und Vinculinkonstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Hüttelmaier zur Verfügung gestellt. Vinculin ist ein Protein, von dem bekannt ist, dass es mit PKC $\alpha$  interagiert (Werth und Pastan, 1984; Ziegler et al., 2002).

### 1.3 Identifizierung, Isolierung und Bestätigung positiver Klone bei der Suche nach PKC $\alpha$ -Liganden im Yeast-two-hybrid-System

Es wurde eine cDNA-Bank 17 Tage alter Mausembryonen und eine humane Herz-cDNA-Bank in jeweils 2 Durchgängen nach PKC $\alpha$ -Liganden durchsucht. Dabei wurden für die Mausembryonen cDNA-Bank pro eingesetztem Mikrogramm DNA etwa  $1,5 \cdot 10^4$  bis  $2,4 \cdot 10^4$  Kolonien erhalten. Bei der Maus Herz-cDNA-Bank waren es etwa  $1,8 \cdot 10^4$  bis  $2,9 \cdot 10^4$  Kolonien. Die Kolonien wuchsen auf Leucin-/Tryptophan-/Histidin-SD-Mangel-Platten. Das Wachstum der Hefen auf Medium ohne Histidin sollte in diesem Yeast-two-hybrid-System nur durch eine Interaktion zwischen PKC $\alpha$ - und cDNA-Bank-Fusionsproteinen möglich sein, denn nur über den rekonstituierten Transkriptionsaktivator sollte die Histidin-Auxotrophie kompensiert werden können. Die Überprüfung der Interaktion mittels des zweiten Reportergens im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay ergab allerdings, dass nur jeweils zwischen 50 und 250 Kolonien positiv waren.

Positive Kolonien wurden aus den Platten ausgestochen und erneut auf Leucin-/Tryptophan-/Histidin-SD-Mangel-Platten ausgestrichen. Der  $\beta$ -Galaktosidase-Assay wurde wiederholt. Nur Kolonien die auch beim zweiten Test ein positives Signal zeigten, wurden in flüssiges Leucin-/Tryptophan-SD-Mangelmedium überimpft. Sie wurden über Nacht inkubiert und die Plasmid-DNA wurden aus ihnen aufgereinigt. Das Gemisch aus cDNA-Bank- und PKC $\alpha$ -Köder Plasmiden wurde nun in *E. coli* transformiert. Die cDNA-Bank-Plasmide wurden im Folgenden aus den Bakterien aufgereinigt und es fand eine Identifizierung der gefundenen Klone mittels Sequenzierung und anschließendem Datenbankvergleich statt. Auf eine weitere Überprüfung von typischen falsch positiven Klonen wurde verzichtet. Typische „falsch Positive“ sind Proteine, die unabhängig davon mit welchem Köderprotein gearbeitet wird, im Yeast-two-hybrid-System fast immer ein positives Signal zeigen. Zu dieser von Serebriiskii und Mitarbeitern (2000) ausführlicher untersuchten Gruppe, gehören verschiedene mitochondriale Proteine, Cytochrom Oxidasen, ribosomale Proteine. Die große Mehrheit der positiv getesteten Kolonien gehörte tatsächlich zu den drei genannten Proteingruppen.

Die jetzt noch verbliebenen Klone (Tabelle 2 und 3) wurden erneut in den *S. cerevisiae* Stamm HF7c transformiert und die exprimierten Proteine, wie in Tabelle 4 zusammengefasst, auf spezifische Interaktion mit PKC $\alpha$  untersucht.

**Tab. III. 2: Gefundenen Klone aus der Maus Embryonalbank (Tag 17)**

<b>Protein</b>	<b>Accession</b>
<b>filamin A</b> [Homo sapiens] (filamin 1, Filamin alpha actin-binding protein-280)	NP_001447

**Tab. III. 3: Gefundene Klone aus der humanen Herzbank**

<b>Protein</b>	<b>Access Nr.</b>
<b>cysteine and glycine-rich protein2</b> [Homo sapiens] (LIM domain, SmLIM)	NP_001312
<b>double LIM protein-1</b> [Mus musculus]	BAA13722
<b>filamin C</b> [Homo sapiens] (gamma filamin, gamma actin-binding protein-280, filamin 2)	NP_001449
<b>Filamin C</b> [Homo sapiens] (gamma filamin, gamma actin-binding protein-280, filamin 2)	AAF67190

**Tab. III. 4: Überprüfung der gefundenen Klone im Yeast-two-hybrid-System**

	FilaminA (pGADT7)	cystein glycin-rich prot.2 (pACT)	Double LIM Prot1 (pACT)	Filamin C (NP_001449) (pACT)	Filamin C (AAF67190) (pACT)
pGBKT7	-	-	-	-	-
pGBKT7 /LamC	-	-	-	-	-
pGBKT7 /PKC $\alpha$ (K368M)	+	+	+	+	+

Minus (-) = keine Interaktion

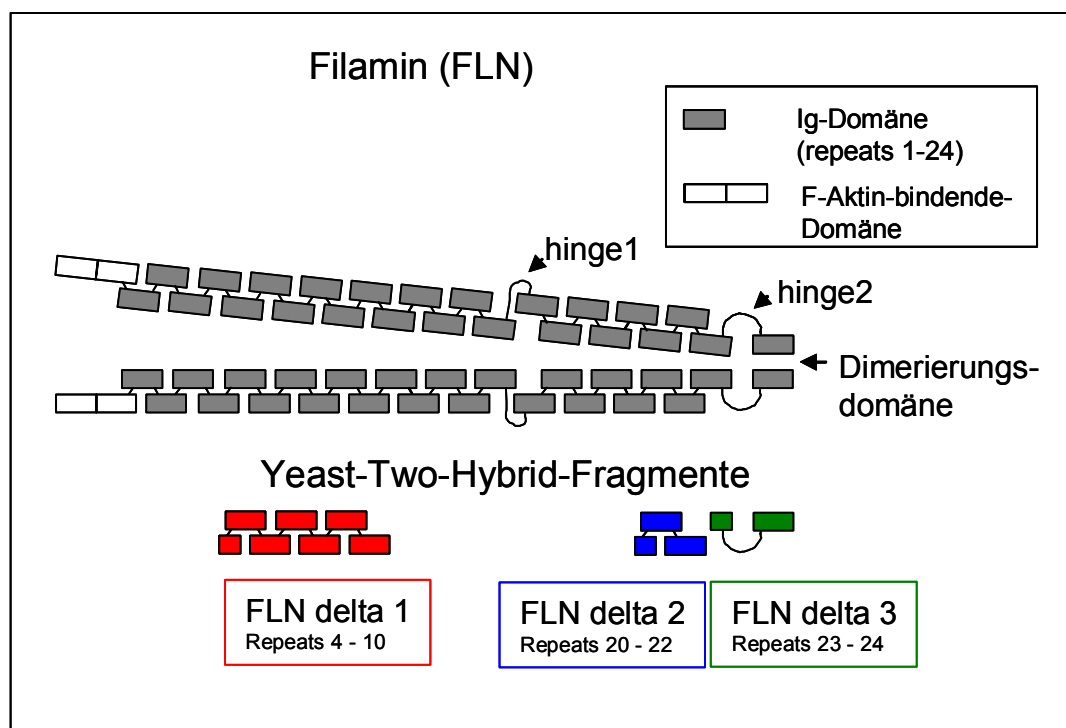
Plus (+) = Interaktion

Wie aus der Tabelle 4 hervorgeht, zeigte keiner der getesteten Klone eine unspezifische Interaktion mit dem DNA-Bindungs-fusionsanteil des Vektors pGBKT7 oder mit dem Kontrollprotein Lamin C (LamC). Die Interaktion mit PKC $\alpha$ -(K368M) hingegen konnte in allen Fällen erneut gezeigt werden. Für LIM-Proteine ist eine Interaktion mit PKC $\alpha$  nicht neu, Kuroda und Mitarbeiter (Kuroda et al., 1996) haben ausgehend von Yeast-two-hybrid-Studien

gezeigt, dass PKC $\alpha$  und weitere PKC-Isotypen mit den LIM-Domänen verschiedener Proteine interagieren.

## 1.4 Die cDNA-Sequenz der positiven Klone

Die cDNAs der gefundenen humanen FilaminA- und FilaminC- (FLNa- und FLNc-) Klone wurden jeweils von beiden Richtungen mit pGADT7- oder pACT-spezifischen Primern ansequenziert. Es zeigte sich, dass der gefundene, ca. 2000 bp große FLNa-Klon (FLN-delta1) einen Teil des Ig-Repeats 4, die Ig-Repeats 5 bis 9 und den Ig-Repeat 10 fast vollständig umfasste. Eine schematische Darstellung Filamins und der gefundenen Klone ist in Abb. 1 zu finden. Einer der beiden FLNc-Klone umfassten einen Teil des Ig-Repeats 20 und dazu die Repeats 21 und 22 (FLN-delta2); dieser Klon war ca. 1400 bp lang. Das zweite gefundene, ca. 900 bp lange FLNc-Fragment (FLN-delta3), umfasste einen Teil des 23. Repeats, die hinge2-Region und Repeat 24. Dieser letzte Repeat ist für die Dimerisierung von FLN verantwortlich.



**Abb.III. 1: Schematische Darstellung von FLN und der in den Yeast-two-hybrid-Suchen gefundenen FLN-Fragmente.** Die drei gefundenen FLN-Isoformen unterscheiden sich in ihren Aminosäure-Sequenzen. Die hinge1-Region ist bei Splicevarianten von FLNb und FLNc nicht vorhanden. Die Aminosäuresequenzen von FLNa und FLNc sind zwischen 72 und 73 % homolog. FLNc besitzt als einzige FLN-Isoform einen 83 Aminosäure langen Einschub im Ig-Repeat 20.

Bei dem Datenbankvergleich, der zur Identifizierung der positiv getesteten Yeast-two-hybrid-Konstrukte vorgenommen wurde, ist als Suchprogramm das „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) (Altschul et al., 1990) genutzt worden. Dieses von der „National Library of Medicine“ im Internet ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) angebotene Programm, vergleicht eine eingegebene Sequenz mit den Sequenzen der Datenbank. Es nutzt dabei einen Algorithmus, der die Ähnlichkeit zwischen zwei gegebenen Aminosäuresequenzen jeweils auch als Bit-score angibt. Die Sequenz, die der eingegebenen am ähnlichsten ist, hat den höchsten Bit-score und wird als bester Treffer angezeigt.

Die beiden FLNc-Klone wiesen beim Datenbankvergleich mit BLAST als besten Treffer jeweils auf ein anderes humanes FLNc-Konstrukt. Die beiden angegebenen FLNc-Proteinsequenzen, mit den Accession Nummern NP\_001449 und AAF67190, unterscheiden sich allerdings in ihrer gesamten Aminosäuresequenz in nur sieben Aminosäuren. In dem Bereich zwischen Repeat 20 und 24, also der Region, die die gefundenen Fragmente umfasst, sind nur zwei Aminosäurereste unterschiedlich.

Die Sequenzhomologie zwischen FLNa und der Muskelform des Filamins, FLNc, beträgt 73,1 Prozent bzw. 71,9 Prozent, berechnet nach der Jotun Hein (Bucka-Lassen et al., 1999) oder der Clustal Methode (Higgins und Sharp, 1988). Für den C-terminalen Bereich ist die Sequenzhomologie zwischen FLNa und FLNc 76,1 bzw. 75,4 Prozent. Diese Homologie ist hoch genug, dass unter den 10 besten „Treffern“ beim BLAST-Datenbankvergleich mit den gefundenen FLN-Sequenzen auch FLNa jeweils mit einem fast gleich hohen Bit-score aufgelistet war. Die Frage, ob das muskelspezifische FLNc deshalb gefunden wurde, weil in hier mit einer Herzmuskelbank gearbeitet wurde und im Herzmuskel FLNc die prädominante FLN-Isoform ist, oder ob PKC $\alpha$  tatsächlich spezifisch mit einem Bereich im FLNa und mit einem anderen Bereich im FLNc interagiert, war im Verlauf der Arbeit zu beantworten. Wichtig war hier der Umstand, dass das gefundene FLNc-Fragment (Delta2) 36 Aminosäuren des 82 Aminosäuren langen FLNc-spezifischen Einschubs besitzt, ein Einschub von dem vermutet wird, dass er für die Spezifität von FLNc-Interaktionen wichtig ist (Xie et al., 1998). Zunächst war es aber nötig, die gefundenen Interaktionen mit weiteren Methoden zu bestätigen.

## **2 Die im Yeast-two-hybrid identifizierten FLN-Fragmente und PKC $\alpha$ lassen sich nach In-situ-Quervernetzung aus HeLa-Zellen ko-Immunpräzipitieren**

Zur Bestätigung der Yeast-two-Hybrid-Ergebnisse wurde die FLN-PKC $\alpha$ -Interaktion mittels Ko-Immunpräzipitationen untersucht.

In diesem System können Protein-Protein Wechselwirkungen mit einem membrangängigen Quervernetzer in situ so stabilisiert werden, dass Proteine, die in der Zelle in Komplexen gemeinsam mit anderen Proteinen vorkommen, nach Zellaufschluss durch Immunpräzipitation gemeinsam mit den Interaktionspartnern sedimentiert und mittels Immunblots nachgewiesen werden können. Als Quervernetzer wurde das membrangängige Lomant's Reagenz (DSP) verwendet.

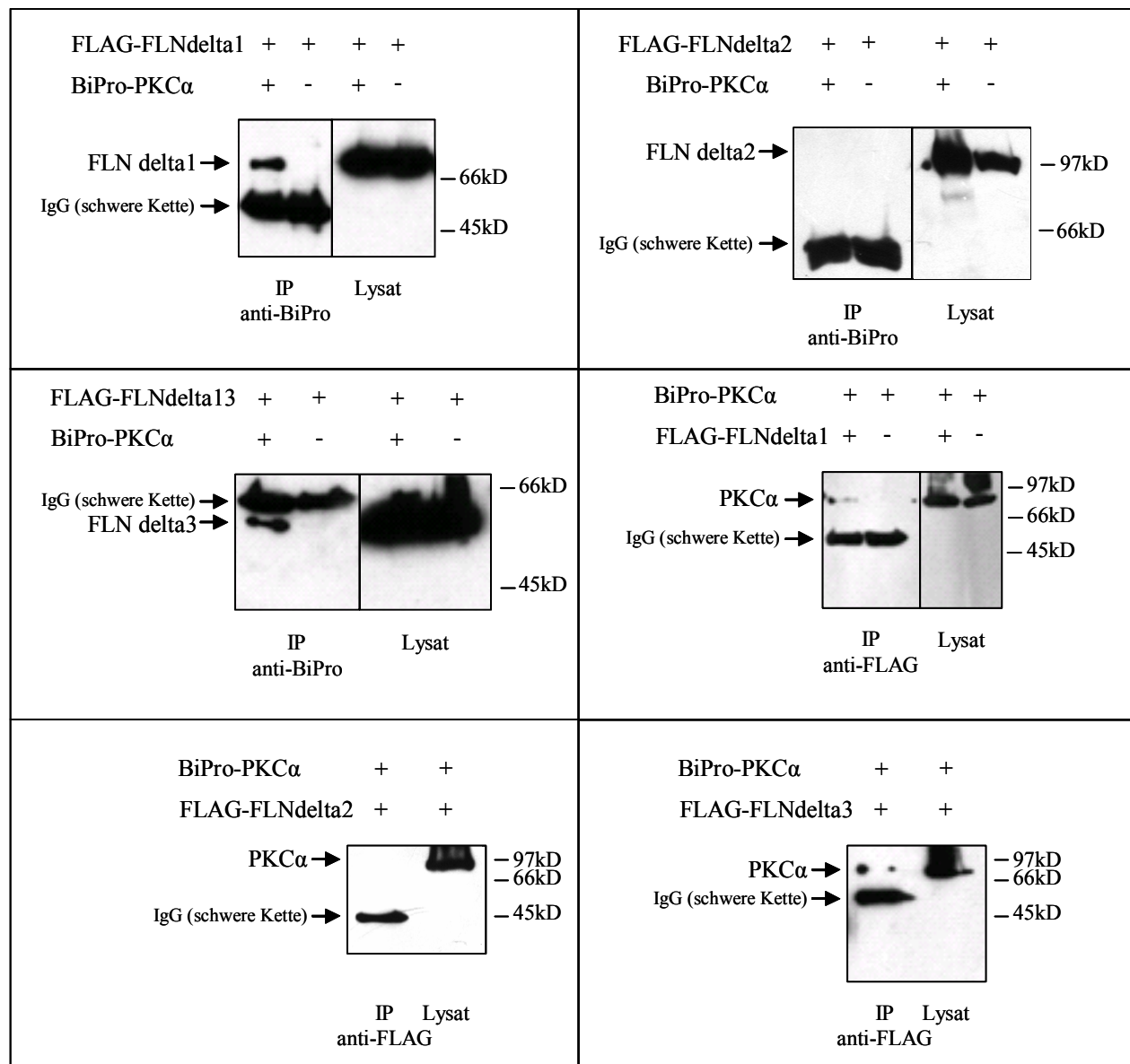
Zur Untersuchung der FLN-PKC $\alpha$ -Interaktion mittels Ko-Immunpräzipitation wurden die gefundenen FLN-Konstrukte zunächst in einen eukaryotischen Expressionsvektor (pcDNA3) umklontiert (siehe 2.1.11).

Die Immunpräzipitation sollte im besten Fall in beide Richtungen möglich sein. Das heißt, die FLN-Fragmente sollten mit PKC $\alpha$  und PKC $\alpha$  mit den FLN-Fragmenten ko-präzipitierbar sein. Um diesen Versuch in beide Richtungen durchführen zu können, mussten die Konstrukte mit jeweils unterschiedlichen Affinitäts-tags versehen sein; hätten beide Konstrukte den gleichen Affinitäts-tag, wäre eine Unterscheidung zwischen präzipitiertem- und ko-präzipitiertem Protein nicht möglich. Die von Dr. Wolfgang Ziegler zur Verfügung gestellten PKC $\alpha$ -pcDNA3-Konstrukte waren mit einem BiPro-tag ausgestattet. Die FLN-Konstrukte wurden darum mit einem FLAG-tag versehen. Dann wurden HeLa-Zellen mit jeweils einem der FLN-Konstrukte alleine oder gemeinsam mit PKC $\alpha$  (Wildtyp) transfiziert (siehe 2.3.4). Auch PKC $\alpha$  (Wildtyp) wurde als Kontrolle alleine in HeLa-Zellen transfiziert. Nach ca. 24 Stunden Expression der Proteine wurde die DSP-Behandlung, und anschließend die Ko-Immunpräzipitation, wie unter 2.3.5 beschrieben vorgenommen.

Es war möglich, nach Präzipitation von PKC $\alpha$  mit BiPro-Antikörper (4A6), FLN-delta1 und –delta3 als Ko-Präzipitat nachzuweisen (Abb. III 2). Andersherum konnte nach Präzipitation von FLN-delta1 und –delta3, mit FLAG-Antikörper, PKC $\alpha$  als Ko-Präzipitat nachgewiesen werden (Abb. III. 2). Mit FLN-delta2 konnten keine Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt werden (Abb. III. 2).

Die verwendeten BiPro- und FLAG-Antikörper zeigten in keinem Fall eine Kreuzreaktion mit dem jeweils anderen Affinitäts-tag und keines der exprimierten Proteine oder Proteinfragmente wurde unspezifisch präzipitiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in HeLa-Zellen PKC $\alpha$  in Komplexen mit den FLN-Fragmenten-delta1 und -delta3 nachgewiesen wurde. Die Interaktion von PKC $\alpha$  mit FLN-Delta2, also mit dem FLNc-Fragment, das einen Teil des FLNc-spezifischen 82-Aminosäuren Einschubs besitzt, ließ sich mittels Ko-Immunpräzipitation nicht bestätigen.



**Abb. III. 2: Ko-Immunpräzipitation von PKCα mit FLN und von FLN mit PKCα.** PKCα-Konstrukte mit einem BiPro-tag wurden zusammen mit den verschiedenen FLNa- und FLNC-Deletionskonstrukten, die jeweils mit FLAG-tags versehen waren, transient in HeLa-Zellen transfiziert. Es wurde dann, nachdem die Zellen mit dem Quervernetzer DSP behandelt wurden, jeweils die exprimierte PKCα mit BiPro-Antikörpern und die exprimierten FLN-Fragmente mit FLAG-Antikörpern immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf NC-Membranen geblottet. Ko-immunpräzipitierte Proteine wurden durch Immunblots nachgewiesen. Als Kontrolle wurde jeweils PKCα- und FLN-Fragment alleine in HeLa-Zellen transfiziert und es wurde untersucht, ob die Proteine unabhängig mit den jeweils anderen Tag-Antikörper präzipitiert werden konnten.



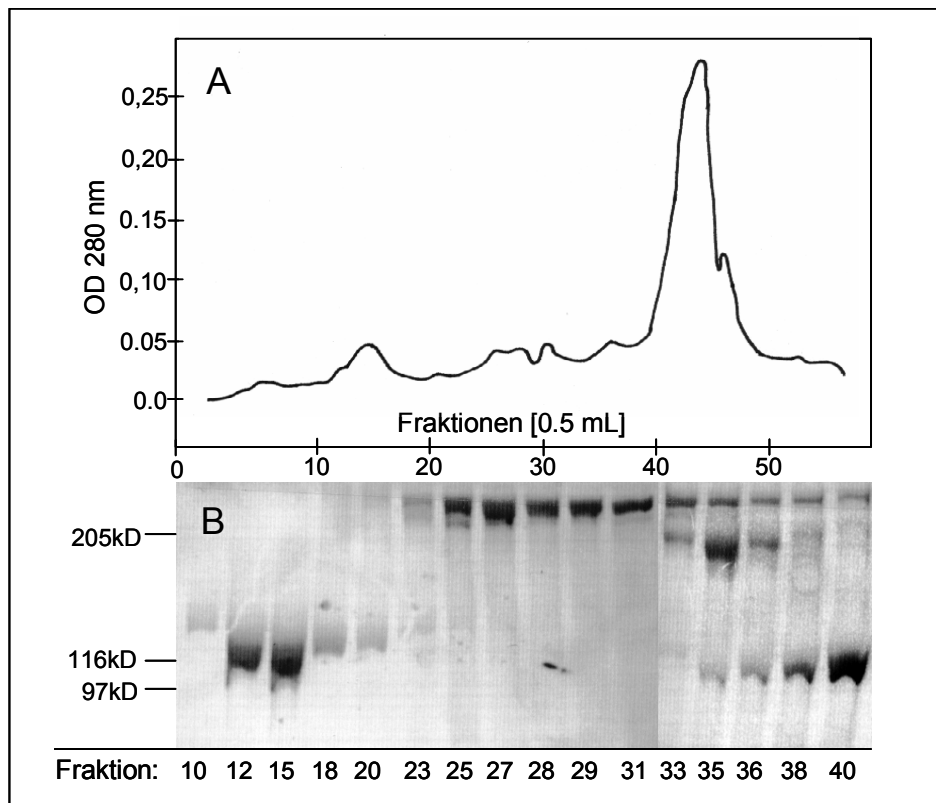
### **3 FLN und PKC $\alpha$ binden in Dot-overlay-Versuchen Ko-Faktor abhängig**

Da nach Ko-Immunpräzipitationen nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Präzipitation der Interaktionspartner über weitere, im Komplex vorkommende Proteine zustande kommt, war es wichtig, die direkte Bindung der beide Proteine nachzuweisen. Ein solcher Nachweis kann durch Dot-overlay-Versuche erbracht werden.

Für diese Experimente ist es nötig, zumindest eines der zu untersuchenden Proteine in aufgereinigter Form vorliegen zu haben. Der andere Bindungspartner kann dann mit Hilfe von Retikulozyten-Lysat in vitro transkribiert und translatiert werden. Um die FLN-PKC $\alpha$ -Interaktion mit diesem System zu untersuchen, wurde FLN aus Putenmagen aufgereinigt.

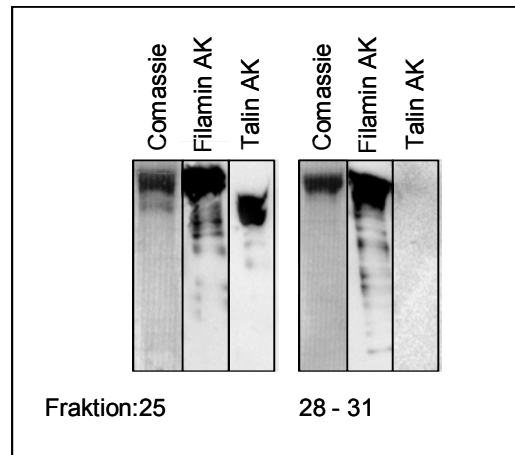
#### **3.1 Präparation von FLN aus Putenmagen**

Die Aufreinigung von FLN aus Putenmagen geschah nach der Methode von Feramisco und Burridge (Feramisco und Burridge, 1980) (siehe 2.2.1). Wie auf Abb. 3, die das Ergebnis einer repräsentativen Aufreinigung über Q-Sepharose zeigt, zu sehen ist, sind die folgenden Proteine typischer Weise zusammen mit dem 280 kDa FLN in den Fraktionen zu finden: Vinculin, 117 kDa, bis Fraktion 23; Talin, 270 kDa, Fraktionen 23 bis 27; Metavinculin, 150 kDa, Fraktionen 33 bis 38 und  $\alpha$ -Actinin, 100 kDa ab Fraktion 35. Das einzige Protein, dessen Abtrennung von FLN also problematisch war, ist Talin; problematisch auch, da der nur geringe Größenunterschied zwischen FLN und Talin zu Irrtümern führen kann.



**Abb. III. 3: FLN-Aufreinigung.** Putenmägen wurden wie unter 2.2.1 beschrieben aufgearbeitet. Nach den beschriebenen Extraktionsschritten enthält die Proteinlösung, wie sich mit spezifischen Antikörpern nachweisen lässt, Vinculin, Talin, FLN, Metavinculin und  $\alpha$ -Actinin als Komponenten. Mit Hilfe einer Q-Sepharose Säule (Pharmacia) wurden die Proteine weiter aufgetrennt. Unter (A) ist das Elutionsprofil der FLN-Aufreinigung zu sehen. Unter (B) ist die SDS-PAGE-Analyse der gleichen Aufreinigung abgebildet. Mit einem 10%igen Gel wurden verschiedenen Fraktionen derselben Aufreinigung aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt.

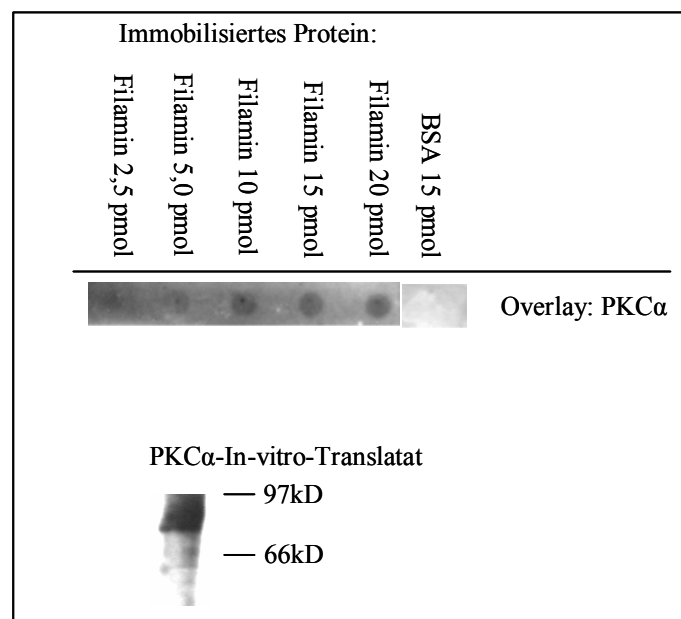
Je nach Qualität der Vorreinigungsschritte über Q-Sepharose- und MonoQ-Säulen (siehe 2.2.1) waren entweder schon Fraktionen vorhanden, die frei von Talin zu sein schienen oder aber die Talin- und FLN-haltigen Fraktionen wurden über eine Gelfiltrationssäule wie unter 2.2.1 beschrieben nachgereinigt. In jedem Fall wurden die Proteinfractionen, mit denen Phosphorylierungs- oder Dot-overlay Experimente durchgeführt wurden, mittels Immunblot auf Spuren von Talin überprüft. Wie auf Abb. 4 zu sehen ist, waren einige der FLN-Fractionen aus der oben dargestellten Aufreinigung frei von Talin. Im Immunblot getestet wurden hier die Fraktionen 25 und die vereinigten Fraktionen 28-31.



**Abb. III. 4: Immunblot der FLN-Aufreinigung.** Eine Probe der Protein-Fraktion 25 und der vereinigten Fraktionen 28-31 wurde mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine wurden entweder Comassie gefärbt oder auf NC-Membranen geblottet. Die immobilisierten Proteine auf der NC-Membran wurden mit Filamin Antikörper oder Talin-Antikörper nachgewiesen. Es wurde ein Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper eingesetzt. Als Nachweis wurde die "Enhanced chemiluminescence" Methode (ECL) eingesetzt.

### 3.2 Putenmagen-FLN bindet im Dot-overlay an PKC $\alpha$

Nach dem Immobilisieren von Putenmagen-FLN auf Nitrocellulosemembran (NC-Membran), wurde diese mit [ $^{35}$ S]Methionin-markierter PKC $\alpha$  inkubiert. Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen. Wie auf Abb. 5 zu sehen ist, bindet PKC $\alpha$  an Putenmagen-FLN. Als Negativkontrolle wurde hier BSA verwendet. Eine Bindung zwischen PKC $\alpha$  und BSA konnte nicht festgestellt werden.



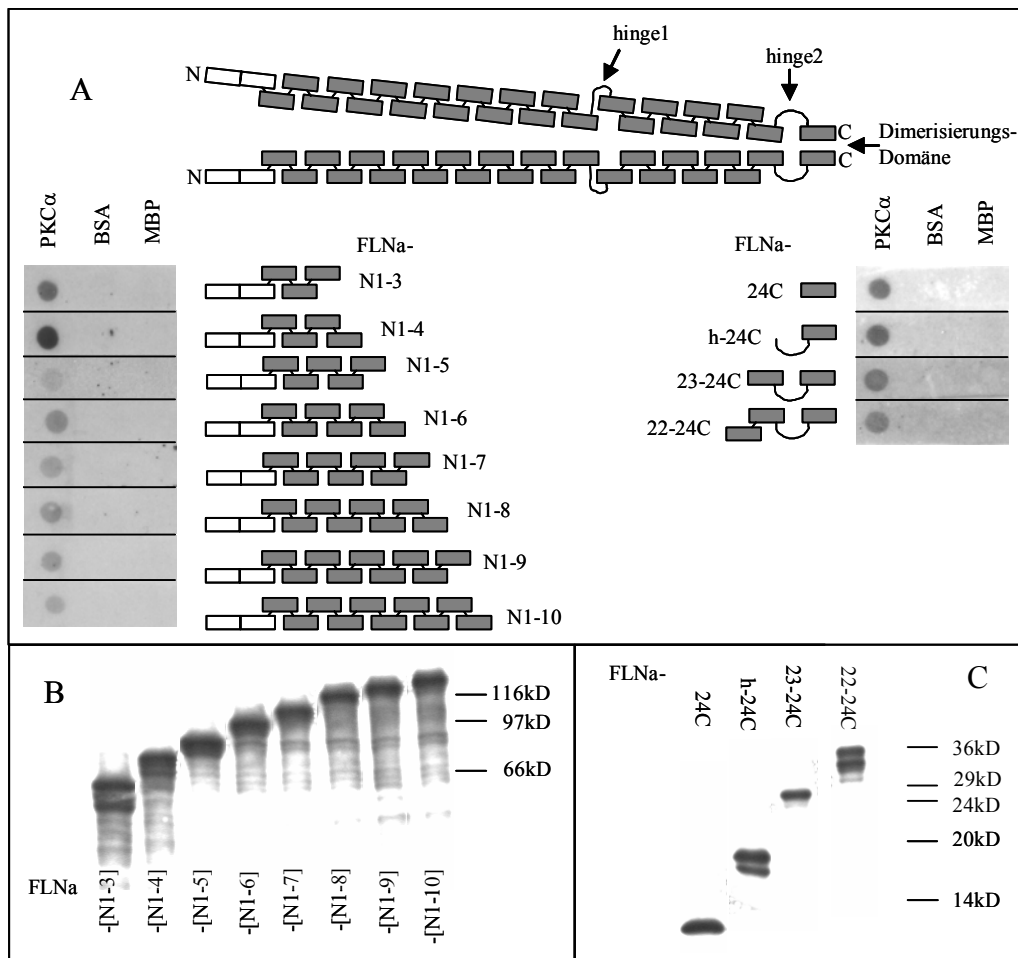
**Abb. III. 5: Dot overlay mit FLN und PKC $\alpha$ .** Aufgereinigtes Putenmagen-FLN wurde in steigenden Konzentrationen (2,5 bis 20 pmol/Spot) auf NC-Membranen immobilisiert. Rinder-Serum-Albumin (BSA) wurde als Negativkontrolle (15 pmol/Spot) ebenfalls immobilisiert. PKC $\alpha$  (Wildtyp) wurde in vitro translatiert und dabei mit [ $^{35}$ S]Methionin markiert. Die NC-Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde mit der radioaktiv markierten PKC $\alpha$  inkubiert. Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen. Der Erfolg der In-vitro-Translation wurde überprüft, indem 2  $\mu$ l des In-vitro-Translations-Ansatzes nach Gelelektrophorese-Auftrennung auf eine NC-Membran geblottet wurden und ebenfalls eine Autoradiographie durchgeführt wurde.

### **3.3 In-vitro-translatiertes und [ $^{35}$ S]Methionin-markiertes FLNa interagiert mit rekombinanter PKC $\alpha$ .**

Es ist nicht auszuschließen, dass Putenmagen-FLN eine Mischung zwischen den Isoformen FLNa und FLNb ist. Beide Isoformen werden in vielen Zelltypen nebeneinander exprimiert (Stossel et al., 2001). Die Frage, ob sich die FLN-PKC $\alpha$ -Interaktion auch mittels in vitro transkribierter und -translatierter FLNa-Fragmente bestätigen lassen würde, war wichtig, um die Frage der Isoformspezifität zu klären. Vor allem stellte sich auch die Frage, ob PKC $\alpha$  sowohl mit einer N-terminalen als auch mit einer C-terminalen Region von FLNa interagieren würde. Die unter III.1.4 aufgeführte hohe Homologie zwischen den C-terminalen Ig-Repeats von FLNa und FLNc lässt vermuten, dass dies so sein könnte.

FLNa ist in den verschiedenen Geweben die FLN-Isoform mit der weitesten Verbreitung. Es wurden daher FLNa-Deletionsfragmente generiert (Abb. III. 6), mit deren Hilfe die Wechselwirkung charakterisiert werden sollte. Dabei wurden, um bestimmen zu können, welche der Ig-Repeats für die FLN-PKC $\alpha$ -Bindung wichtig sind, an den Enden der Fragmente jeweils ein oder mehrere Ig-Repeats deletiert (Abb. III. 6).

Die Konstrukte wurden in vitro transkribiert und translatiert und dabei mit [ $^{35}$ S]Methionin markiert. Rekombinante PKC $\alpha$  (Panvera, Madison, USA) wurde dann auf NC-Membran immobilisiert und mit den radioaktiv markierten FLNa-Fragmenten inkubiert. Gebundenes Protein wurde mit Autoradiographie nachgewiesen (Abb. III. 6)



**Abb. III. 6 Dot overlay mit PKC $\alpha$  und FLN-Deletionsfragmenten.** Die unter A dargestellten FLN-Deletionsfragmente wurden mittels In-vitro-Transkription und -Translation synthetisiert und mit [ $^{35}$ S]Methionin radioaktiv markiert. Rekombinante PKC $\alpha$ , jeweils 15 pmol pro Spot, wurde auf NC-Membran immobilisiert. Als Negativkontrolle wurden jeweils 15 pmol/Spot BSA und Maltose Binding Protein (MBP) ebenfalls auf NC-Membran immobilisiert (A). Die NC-Membranen mit den immobilisierten Proteinen wurden mit den synthetisierten N-terminalen (B) und C-terminalen (C) FLN-Deletionsfragmenten inkubiert. Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen (A). Jeweils 5  $\mu$ l des jeweiligen In-vitro-Translatats wurden mittels PAGE aufgetrennt und geblottet. Die synthetisierten und radioaktiv markierten Proteine wurden mit Hilfe von Autoradiographien nachgewiesen (B,C).

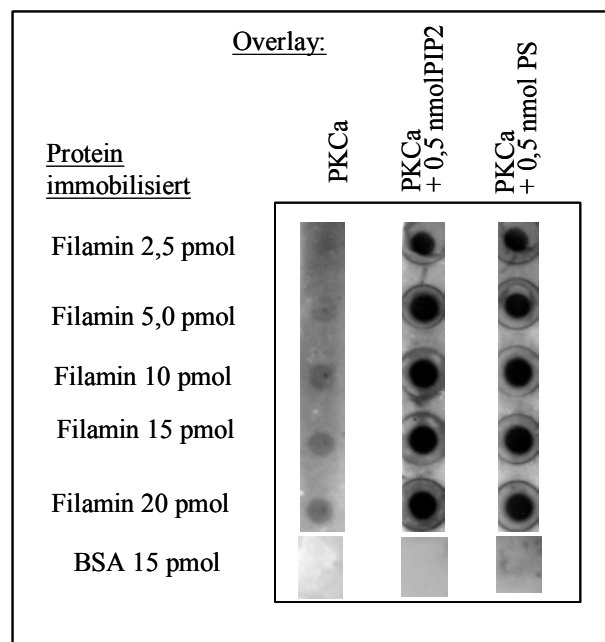
Die synthetisierten FLNa-Deletionsfragmente konnten alle an immobilisierte PKC $\alpha$  binden. Die beiden kürzesten N-terminalen Fragmente zeigten dabei überraschend eine stärkere Bindung an PKC $\alpha$  als die längeren N-terminalen Fragmente; ein Ergebnis, das einen Einfluss der „offenen Enden“ der Ig-Repeats vermuten lässt. Beim FLN-Gesamtprotein wird angenommen, dass die Ig-Repeats sich durch hydrophobe Wechselwirkungen aneinander lagern (Gorlin et al., 1990), ein Umstand, der vermutlich den stabähnlichen Charakter des Proteins verursacht und der in den schematischen FLN-Abbildungen durch die Verschachtelung der Repeats angedeutet ist (z.B. Abb. 6). Werden ganze Ig-Repeats deletiert, ergeben sich „offene Enden“, deren Bindungseigenschaften mit Vorsicht interpretiert werden müssen.

Die Ergebnisse des beschriebenen Versuchs lassen noch keine Lokalisation der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion zu, unterstützen aber die zuvor formulierte Vermutung, dass PKC $\alpha$  sowohl N- als auch C-terminal an FLNa bindet.

### **3.4 Die FLN-PKC $\alpha$ -Interaktion ist Ko-Faktor abhängig**

Da sowohl PKC $\alpha$  als auch FLN Lipid-bindende Proteine sind (Murray und Honig, 2002; Goldmann et al., 1999), stellte sich die Frage, ob die Wechselwirkung von PKC $\alpha$  mit FLN Lipidabhängig ist. Um dies zu beantworten, wurde Putenmagen-FLN vor dem Immobilisieren auf NC-Membran mit den sauren Phospholipiden Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und Phosphatidylserin (PS) inkubiert. Auch Putenmagen-FLN alleine wurde auf NC-Membran immobilisiert. Als Negativkontrolle diente BSA. Das immobilisierte Protein wurde, wie unter 2.2.8 beschrieben mit [<sup>35</sup>S]Methionin-markierter PKC $\alpha$  inkubiert. Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen.

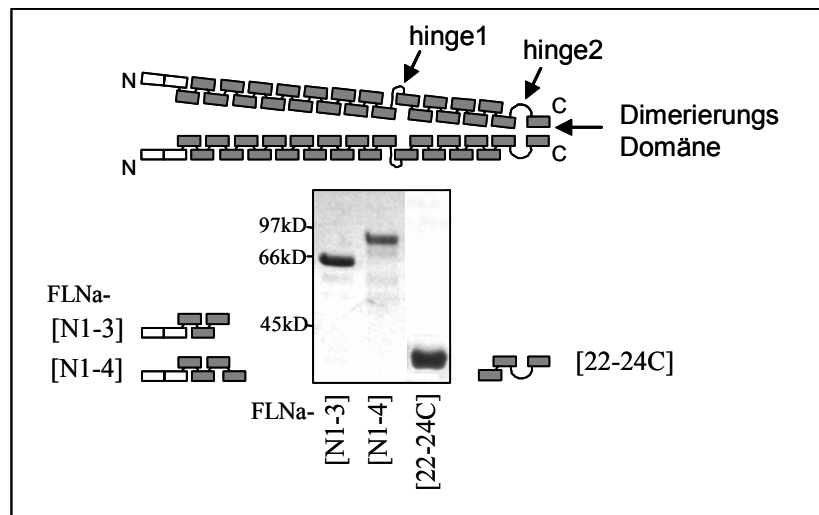
Wie die Abb. 7 zeigt, hatten die beiden verwendeten sauren Phospholipide (PIP<sub>2</sub> und PS) einen starken Einfluss auf die Bindung von in-vitro-translatierter PKC $\alpha$  an FLN. Sowohl die Präinkubation von FLN mit PIP<sub>2</sub> als auch mit PS verstärkte die FLN-PKC $\alpha$ -Interaktion deutlich. In keinem Fall band PKC $\alpha$  an BSA.



**Abb. III. 7: Ko-Faktor-Abhängigkeit der FLN-PKC $\alpha$ -Bindung.** Wie für den in Abb. III. 5 dargestellten Versuch wurde Putenmagen-FLN in steigenden Konzentrationen auf NC-Membranen immobilisiert. BSA diente als Negativkontrolle. Bei diesem Versuch wurde aber FLN vor dem Immobilisieren bei einigen Proben mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) oder Phosphatidylserin (PS) inkubiert. Die NC-Membranen mit den immobilisierten Proteinen wurden, wie zuvor beschrieben, mit der in-vitro-translatierten PKC $\alpha$  inkubiert. Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen

### 3.5 Die Ko-Faktor-abhängige FLN-PKC $\alpha$ -Interaktion lässt sich auch mit rekombinanten FLNa-Fragmenten bestätigen

Um die Interaktion zwischen FLN und PKC $\alpha$  gezielter zu untersuchen, wurden einige der generierten Deletionsfragmente mit einem FLAG-tag versehen und als 6 x His-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 2.2.3).



**Abb. III. 8: Aufreinigung von FLNa-Deletionsfragmenten über Ni-NTA-Sephrose.** Die FLNa-Fragmente wurden in *E. coli* bei 37 °C über 4 Stunden oder über 12 Stunden bei 24 °C exprimiert. Die N-terminalen Konstrukte wurden immer bei der niedrigeren Temperatur exprimiert, um die bei diesen Proteinfragmenten stärkere Degradation möglichst gering zu halten. Die Aufreinigung der Fragmente über Ni-NTA-Sephrose wurde wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Jeweils 5 µl der aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend Coomassie-Blau gefärbt.

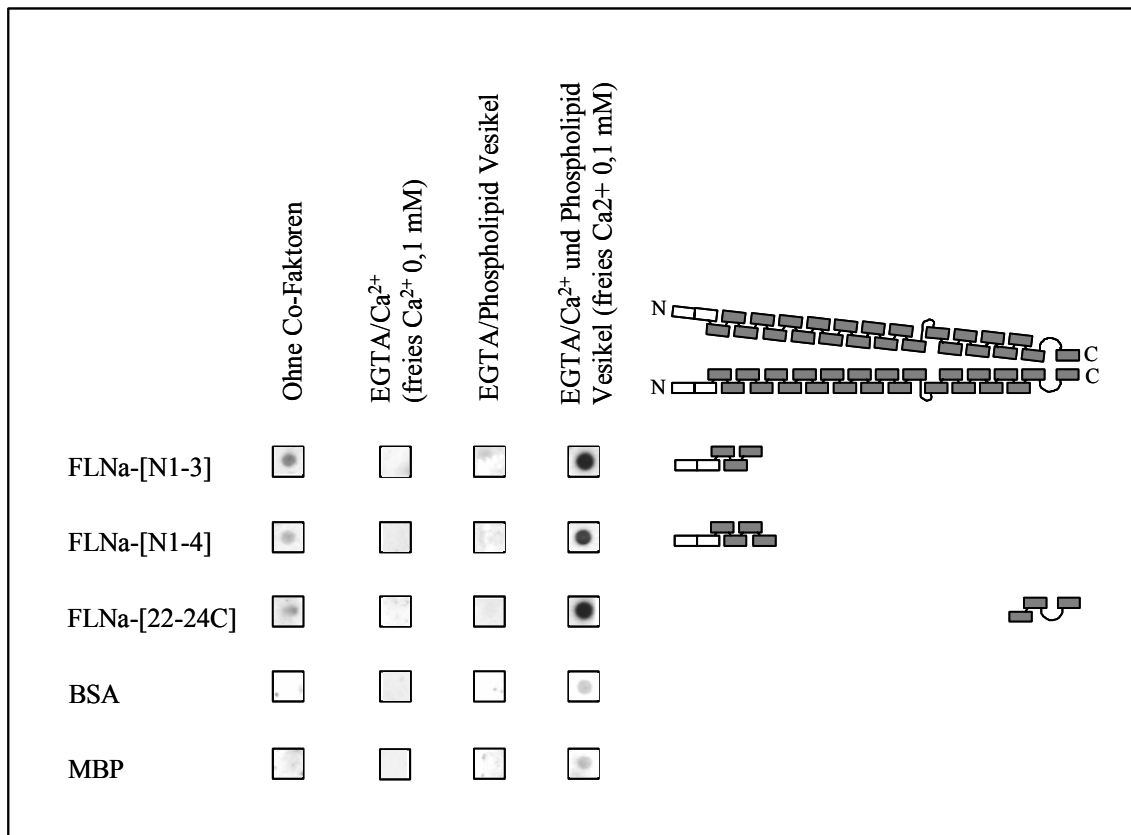
Mit den beiden N-terminalen und dem C-terminalen FLNa-Fragment wurde die Ko-Faktor-Abhängigkeit noch einmal mittels dot-overlay-Experimenten untersucht. Da die Aktivität von PKC $\alpha$  Calcium-abhängig ist, wurde außer dem Einfluss von Phospholipiden auch der Einfluss von Calcium getestet.

Für diesen Versuch wurden die aufgereinigten FLNa-Fragmente und Kontrollproteine (BSA und MBP) wie zuvor beschrieben mit Phospholipiden inkubiert. Dieses Mal wurden allerdings nicht einzelne Phospholipide benutzt, sondern ein Gemisch verschiedener Phospholipide. Die Zellmembranen von Säugerzellen sind, ihre Lipidzusammensetzung betreffend, hochkomplex und Zelltyp-spezifisch. Es wurden die Phospholipide PS und PIP<sub>2</sub> mit Phosphatidylcholin (PC) gemischt. Das zwitterionische PC verhindert, dass die genutzten Vesikel eine zu stark negative Ladung aufweisen. Das PC : PS : PIP<sub>2</sub> Verhältnis in den genutzten Vesikeln war 9 zu 9 zu 2.

Nach der Inkubation der Proteine mit dem Phospholipidgemisch wurden sie zusammen mit unbehandelten FLNa-Fragmenten, BSA und MBP auf NC-Membranen immobilisiert. PKC $\alpha$  wurde mittels In-vitro-Transkription und -Translation synthetisiert und mit [<sup>35</sup>S]Methionin markiert. Die immobilisierten Proteine wurden mit der radioaktiv markierten PKC $\alpha$  alleine oder in Gegenwart von 0,5 mM EGTA oder 0,6 mM Calcium und 0,5 mM EGTA inkubiert. In den Ansätzen in denen sowohl Calcium als auch EGTA vorlag war die Konzentration an freiem Calcium etwa 0,1 mM. (Mit dem Programm WEBMAXC STANDARD von MAXCHELATOR ([www.stanford.edu/%7Ecpatton/webmaxcS.htm](http://www.stanford.edu/%7Ecpatton/webmaxcS.htm)) errechnet sich für die



gegebenen EGTA- und Calciumkonzentrationen eine freie Calciumkonzentration von 0,1000454 mM). Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen.

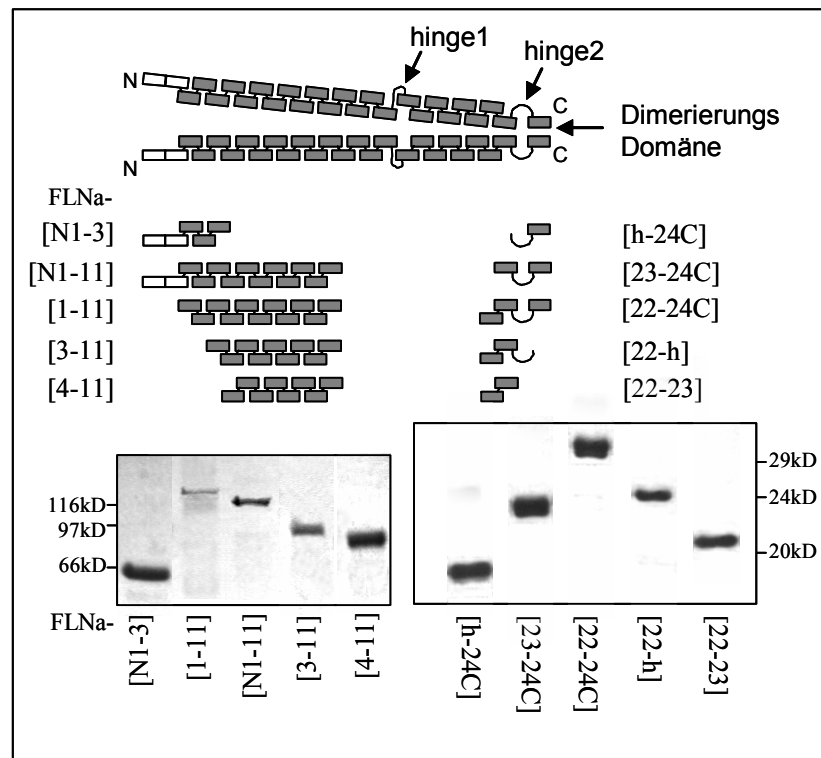


**Abb. III. 9: Untersuchung der Ko-Faktorabhängigkeit der FLNa-PKC $\alpha$ -Bindung.** N- und C-terminale FLNa-Fragmente und als Negativkontrolle BSA und MBP wurden mit Phospholipiden (PC:PS:PIP<sub>2</sub>; 9:9:2) vorinkubiert oder unbehandelt gelassen. Auf NC-Membranen immobilisiert, wurden die Proteine mit PKC $\alpha$  inkubiert, die zuvor mittels In-vitro-Transkription und -Translation generiert und mit [<sup>35</sup>S]Methionin markiert wurde. Die Inkubation der immobilisierten Proteine erfolgte teilweise in Anwesenheit von 0,6 mM Calcium und 0,5 mM EGTA oder 0,5 mM EGTA alleine. Die kombinierten Konzentrationen von Calcium und EGTA ergaben eine freie Calciumkonzentration von ca. 0,1 mM. Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Der starke Einfluss von Phospholipiden auf die Bindung von PKC $\alpha$  an FLN, wie er sich in den dot-overlay-Versuchen mit in vitro synthetisierter PKC $\alpha$  und Putenmagen-FLN dargestellt hatte, ließ sich mit den rekombinanten FLNa-Fragmenten bestätigen. Sowohl die beiden N-terminalen als auch das C-terminale FLNa-Fragment interagierten deutlich stärker mit PKC $\alpha$  in Gegenwart von Phospholipiden. Es zeigte sich zudem, dass die Bindung von PKC $\alpha$  und FLNa auch calciumabhängig war. An die nur mit Phospholipiden inkubierten FLN-Fragmente band PKC $\alpha$  nicht. Bei den Kontrollproteinen BSA und MBP wurde in Gegenwart von Calcium und Phospholipiden ein schwaches Hintergrundsignal beobachtet.

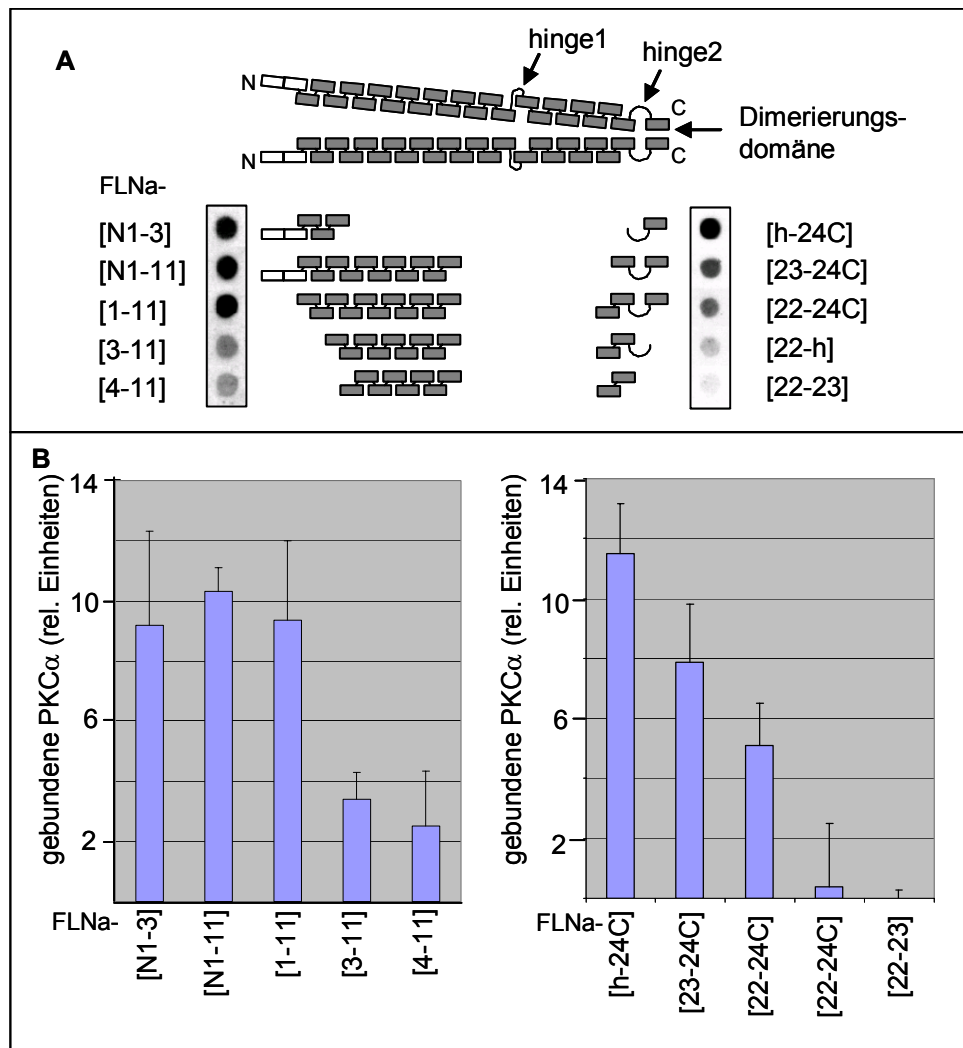
### 3.6 Eingrenzung der FLNa-Regionen, die an PKC $\alpha$ binden

Da einzelne FLN-Regionen von besonderer Bedeutung sind - die N-terminal gelegenen zwei Calponin-Homology-Domänen für die Aktin-Bindung, der Ig-Repeat 24 für die Dimerisierung, die hinge2-Region für die Calpain-Spaltung usw. – war es wichtig, die FLN-Bindungsregionen für PKC $\alpha$  weiter zu charakterisieren. Informationen darüber, wo PKC $\alpha$  an FLN bindet, sollten Hinweise bezüglich der Bedeutung der Interaktion geben. Da bei den vorherigen Dot-overlay-Versuchen (mit immobilisierter PKC $\alpha$  und in-vitro-synthetisierten FLN-Fragmenten) die Bindungsregionen nicht weiter eingegrenzt werden konnten, wurden weitere FLNa-Deletionsfragmente generiert, als 6 x His-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und über Ni-NTA-Sepharose aufgereinigt (Abb. III. 10).



**Abb. III. 10: Aufreinigung weiterer FLNa-Deletionsfragmente über Ni-NTA-Sepharose.** Die FLNa-Fragmente wurden in *E. coli* bei 37 °C über 4 Stunden oder bei 24 °C über 12 Stunden exprimiert. Da bei den N-terminalen Konstrukten die Degradation besonders ausgeprägt war, wurden sie immer bei der niedrigeren Temperatur exprimiert. Die Aufreinigung der Fragmente über Ni-NTA-Sepharose wurde wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Jeweils 5 µl der aufgereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend Coomassie-Blau-gefärbt.

Wie zuvor bei den Versuchen zur Ko-Faktorabhängigkeit der FLNa-PKC $\alpha$ -Bindung, wurden mit den zusätzlichen FLNa-Deletionsfragmenten Dot-overlay-Versuche durchgeführt. Allerdings dieses Mal nur in Anwesenheit von Phospholipiden und Calcium, also unter den Bedingungen, bei denen sich die Bindung von FLNa an PKC $\alpha$  am stärksten gezeigt hatte.



**Abb. III. 11: Identifizierung der FLNa N- und C-terminalen Regionen, die an PKCα binden.** N- und C-terminale FLNa-Deletionskonstrukte wurden mit Phospholipidvesikeln inkubiert und auf NC-Membranen immobilisiert. PKCα wurde mittels In-vitro-Transkription und -Translation synthetisiert und mit [<sup>35</sup>S]Methionin markiert. Die immobilisierten Proteine wurden in Gegenwart von Calcium mit der synthetisierten PKCα inkubiert. (A) Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen oder (B) oder mit dem Phosphorimager quantifiziert. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler von 3 bis 4 unabhängigen Versuchen wieder.

Die Dot-overlay-Versuche zur Bestimmung der PKCα-Bindungsregionen ergaben, dass für die FLNa-PKCα-Interaktion C-terminal der Ig-Repeat 24 und die hinge2-Region nötig sind. Da die Negativkontrollen, BSA und MBP, eine schwache Bindung an PKCα zeigten, wurden die Untersuchungen 3 bis 4 Mal wiederholt und statt durch Autoradiographie wurde gebundenes, radioaktiv markiertes Protein mit einem Phosphorimager quantitativ nachgewiesen. Die Bindung der Negativkontrollen an PKCα wurden jeweils von allen FLNa-Werten abgezogen.

Die statistische Auswertung der Daten ergab, dass die FLNa-Fragmente h-24C, 23-24C und 22-24C tatsächlich, wie es auf der in Abb. 11 dargestellten Autoradiographie schon zu erkennen ist, nicht gleich stark an PKCα banden, sondern dass die Affinität der Fragmente für

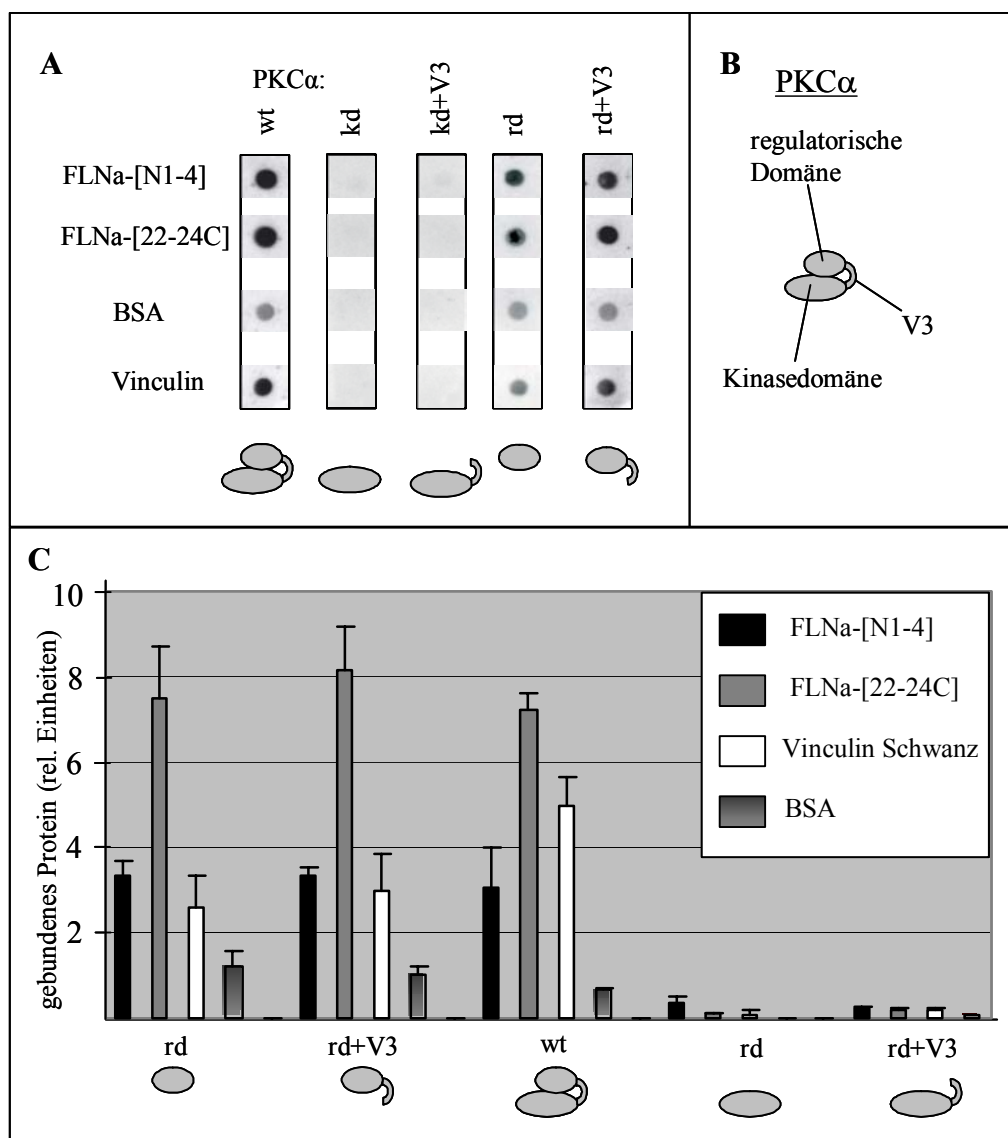
PKC $\alpha$  umso stärker war, umso kürzer die Fragmente waren. Ein ähnlicher Effekt hatte sich auch bei den unter III.3.3 beschriebenen Dot-overlay-Versuchen dargestellt. Wie schon erwähnt, wird er eventuell durch die normalerweise nicht offen liegenden, hydrophoben Seiten der Ig-Repeats verursacht. Ferner könnte es auch sein, dass bei FLN-Fragmenten, die den 24. Ig-Repeat umfassen, unterschiedlich starke sterische Effekte durch Dimerbildung auftreten. Es konnte in jedem Fall deutlich gezeigt werden, dass ohne den 24. Ig-Repeat und die hinge2-Region fast keine PKC $\alpha$ -Bindung möglich war. Vor allem der für die Dimerisierung verantwortliche 24. Ig-Repeat ist also für die Bindung bedeutend. Eine Deletion dieser Domäne hat den stärksten Effekt auf die PKC $\alpha$  Bindung.

N-terminal erwiesen sich die Ig-Repeats 1 und 2 als die Region der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion. Deutlich wurde, dass die CH-Domänen, welche die Bindung von FLN an F-Aktin und saure Phospholipide vermitteln, keinen Anteil an der FLNa-PKC $\alpha$ -Bindung hatten. Die Hintergrundbindung war N-terminal allerdings noch stärker als C-terminal. Eine statistische Auswertung von 4 Dot-overlay-Versuchen, wie für den C-terminalen Bereich durchgeführt, bestätigte aber was auf der Abb. III 11 bereits zu erkennen ist. Als Kontrolle wurden auch hier BSA und MBP eingesetzt.

### 3.7 Eingrenzung der PKC $\alpha$ -Bindungsregion für FLNa

Nachdem ermittelt war, mit welchen FLNa-Motiven PKC $\alpha$  wechselwirkt, stellte sich die Frage, mit welchen Domänen PKC $\alpha$  an FLNa bindet. Bei den meisten PKC $\alpha$ -Interaktionen ist es die regulatorische Untereinheit, die mit Interaktionspartnern in Wechselwirkung tritt. Allerdings gibt es auch PKC $\alpha$ -Protein-Interaktionen für die die V3-Region der Kinase bedeutsam ist (Parsons et al., 2002). Insgesamt sollte die Ermittlung des PKC $\alpha$ -Bereichs, der für die FLNa-Bindung verantwortlich ist, Rückschlüsse auf die Natur der FLNa-PKC $\alpha$ -Wechselwirkung ermöglichen.

Die experimentelle Ermittlung der PKC $\alpha$ -Bindungsregion für FLNa erfolgte in Zusammenarbeit mit Bettina Koch, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit diese Frage bearbeitete. Wie zuvor wurden FLNa-Fragmente (N1-4 und 22-24C) mit Phospholipiden versetzt, auf NC-Membran immobilisiert und in Gegenwart von Calcium mit in-vitro-synthetisierten und mit [ $^{35}$ S]Methionin markierten PKC $\alpha$ -Fragmenten inkubiert. Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen (Abb. III. 12) und mit Hilfe eines Phosphorimagers quantifiziert. Insgesamt 4 Experimente wurden statistisch ausgewertet (Abb. III. 12).



**Abb. III. 12: Identifizierung des PKCα-Bereichs, der an FLNa binden.** Das N-terminale FLNa-Fragment N1-4, das C-terminale Fragment 22-24C und als Kontrollproteine BSA und Vinculin wurden jeweils mit Phospholipiden inkubiert und auf NC-Membran immobilisiert. Verschiedene PKCα-Deletions-Fragmente und PKCα Wildtyp (PKCα WT) wurden in vitro transkribiert, -translatiert und mit [<sup>35</sup>S]Methionin markiert. Die NC-Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde mit den synthetisierten, radioaktiv markierten Proteinen in Gegenwart von Calcium inkubiert. (B) Als PKCα-Deletionsfragmente wurden genutzt: die regulatorische Untereinheit (rd) alleine und zusammen mit der V3-Region (rd+V3) und die Kinaseuntereinheit (kd) alleine und zusammen mit der V3-Region (kd+V3) (A) Gebundenes Protein wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen. (C) Vier Dot-overlay-Versuche wurden mit Hilfe eines Phosphorimager quantifiziert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der 4 unabhängigen Versuche.

Wie auf der repräsentativen Autoradiographie (Abb. III. 12) zu sehen ist, ist auf der PKCα-Seite die regulatorische Untereinheit für die FLNa-Bindung unbedingt notwendig. Wie auch die Phosphorimager-Quantifizierung und die statistische Auswertung von 4 Experimenten zeigt, ist eine Bindung von FLNa an die PKCα-Kinaseuntereinheit, mit oder ohne V3-Region, praktisch nicht nachweisbar. Deutlich gezeigt werden konnte auch, dass die PKCα-Bindung

and FLNa C-terminal etwa doppelt so stark ist wie N-terminal. Der N-terminale Bereich bindet an PKC $\alpha$ -Deletionskonstrukte in etwa so stark wie der Vinculin-Schwanz, der hier als Kontrolle verwendet wurde. Die Vinculin-PKC $\alpha$ -Interaktion und die Lipid-Abhängigkeit dieser Wechselwirkung konnte bereits nachgewiesen werden (Ziegler et al., 2002). Im Vergleich zur Vinculin-PKC $\alpha$ -Bindung, bei der die Kinaseuntereinheit zur Bindungsstärke beiträgt, ist die FLNa-PKC $\alpha$ -Bindung unter diesen Versuchsbedingungen offensichtlich nur durch die regulatorische Untereinheit vermittelt.

### **3.8 Untersuchung der FLN-Phosphorylierung durch PKC $\alpha$**

Dass FLN durch PKC $\alpha$  in vitro phosphoryliert wird ist bereits bekannt, seit vor allem in den 1980er Jahren viele Cytoskelett-assoziierte Proteine daraufhin untersucht wurden, ob sie durch PKC $\alpha$  oder andere Kinasen phosphoryliert werden (Kawamoto und Hidaka, 1984). Die Details der FLN-Phosphorylierung blieben jedoch weitgehend ungeklärt. Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass FLNa in verschiedenen Testsystemen mit PKC $\alpha$  interagiert, war es nötig, die Frage der Phosphorylierung genauer zu untersuchen.

#### **3.8.1 In-vivo-Phosphorylierung von FLNa**

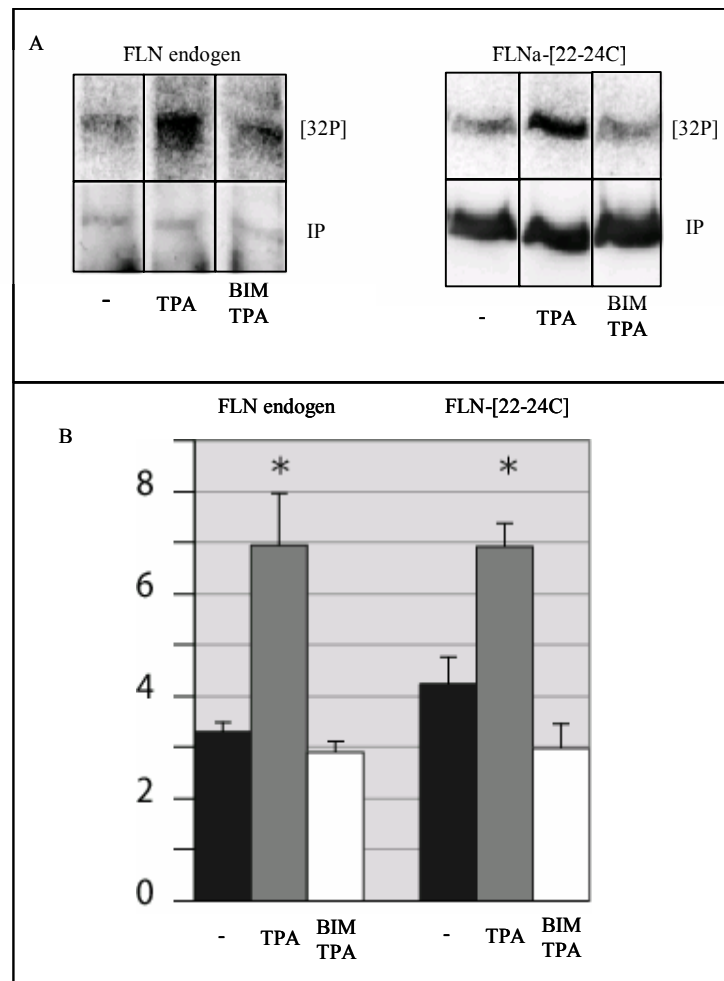
Da eine In-vitro-Phosphorylierung durch eine beliebige Kinase keineswegs bedeutet, dass die jeweils untersuchte Phosphorylierung auch in vivo stattfindet, war es wichtig herauszufinden, ob FLNa auch in lebenden Zellen durch PKC $\alpha$  phosphoryliert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein Versuchsansatz mit selektiven Aktivatoren und Inhibitoren der PKC gewählt. Zum einen wurde PKC durch den Phorbolster TPA stimuliert und zum anderen bei einigen Versuchsansätzen gleichzeitig durch den spezifischen cPKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIM) inhibiert wurde. Dass TPA die Phosphorylierungsstärke von FLN in vivo verstärken kann, ist im Rahmen der Untersuchung der FLN-Phosphorylierung durch die Pak1-Kinase von Vadlamudi und Mitarbeitern bereits gezeigt worden (Vadlamudi et al., 2002). Allerdings aktiviert TPA die PKC deutlich weniger spezifisch, als eine zeitlang angenommen wurde. Es sind mittlerweile diverse Proteine bekannt, die ebenfalls, wie PKC, eine C1-Domäne besitzen. TPA bindet an die C1-Domänen all dieser Proteine und bewirkt deren Translokation an die Membran (Kazanietz, 2000). Um also auszuschließen, dass es sich bei einem beobachteten Effekt um die direkte oder indirekte Aktivierung einer anderen

Kinase handelt, wurde der cPKC-spezifische Inhibitor BIM verwendet. BIM bindet in niedrigen Konzentrationen nur an das ATP-Bindungsmotive der konventionellen PKCs (Davies et al., 2000; Martiny-Baron et al., 1993). Ist die Steigerung der Phosphorylierungsrate eines Proteins nach TPA-Zugabe ein PKC-Effekt, so sollte sich dieser Effekt durch die Anwesenheit eines spezifischen PKC-Inhibitor verhindern lassen.

Für die Durchführung dieses Versuchs wurden HeLa-Zellen unbehandelt gelassen oder mit dem FLNa [22-24C]-Konstrukt transient transfiziert. Sobald die Zellen dann bis zur Konfluenz angewachsen waren, wurden sie, wie unter II.2.3.6 beschrieben, einem Minimal-Medium ohne Serum ausgesetzt und einige Stunden mit [ $^{32}$ P]Orthophosphat als einziger Phosphatquelle gehalten. Schließlich wurden die Zellen entweder mit TPA oder TPA/BIM behandelt oder unbehandelt gelassen und endogenes FLN bzw. das exogene C-terminale FLNa-Fragment [22-24C] wurden immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitation erfolgte wie unter 2.3.5 beschrieben entweder mit FLN-Antikörpern oder im Falle des FLNa-Deletionsfragments mit FLAG-Antikörpern (alle FLNa-Konstrukte waren mit einem FLAG-tag versehen). Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf NC-Membran geblottet und die [ $^{32}$ P]Inkorporation wurde mit Hilfe eines Phosphorimagers quantifiziert. Im Anschluss an die Quantifizierung wurde mit den NC-Membranen ein Westernblot durchgeführt, um zum einen zu verifizieren, dass es sich bei den quantifizierten Banden auch tatsächlich um FLN bzw. FLNa-[22-24C] handelt und zum anderen, um so die Proteinmenge in den Banden als Referenzwert zu ermitteln. Dieser Versuch wurde 4 bis 6 Mal wiederholt und die [ $^{32}$ P]Inkorporation nach den verschiedenen Behandlungen wurde statistisch ausgewertet.

Wie eine Betrachtung der repräsentativen Phosphorimager-Bilder (Abb. III. 13) und auch der statistisch ausgewerteten Phosphorimager-Daten zeigten, ist nach TPA-Zugabe die [ $^{32}$ P]Inkorporation deutlich verstärkt. Eine Verdoppelung der [ $^{32}$ P]Inkorporation war im Falle des endogenen FLN beobachtbar. In beiden Fällen war in Anwesenheit von BIM keine verstärkte [ $^{32}$ P]Inkorporation feststellbar.



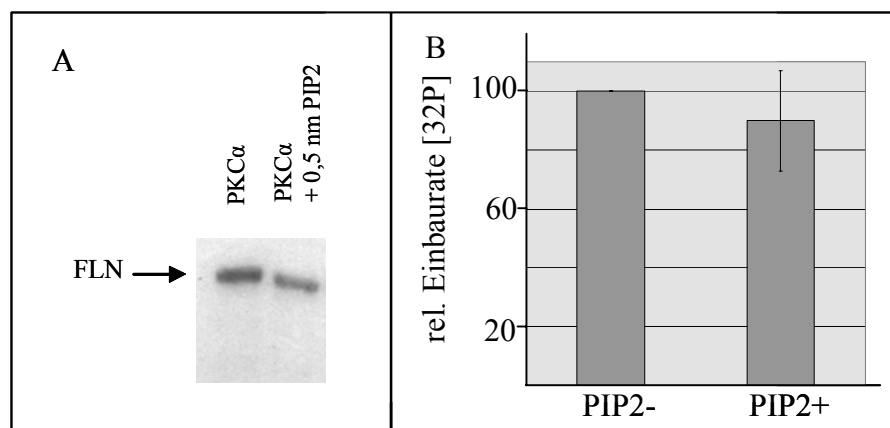


**Abb. III.13: In-vivo-Phosphorylierung von FLN durch PKC $\alpha$ .** Transient transfizierte (FLNa-[22-24C]) und nicht transfizierte Hela-Zellen wurden 24 Stunden einem Medium ohne Serum ausgesetzt und anschließend für 16 Stunden zusätzlich mit [ $^{32}$ P]Orthophosphat als einziger Phosphatquelle gehalten. Die Zellen wurden mit dem PKC-Aktivator TPA oder mit TPA und dem cPKC-Inhibitor BIM behandelt oder unbehandelt gelassen. Nachfolgend wurde endogenes FLN bzw. FLNa-[22-24C]-Fragment präzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf NC-Membranen geblottet. (A) Die [ $^{32}$ P]Inkorporation wurde mit Hilfe eines Phosphorimagers quantifiziert. Die Proteinmenge in den Gelen wurde über Coomassie-Blau-Färbung und anschließende Densitometrie quantifiziert. (B) Die [ $^{32}$ P]Inkorporation wurde ins Verhältnis gesetzt zur Proteinmenge. Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler von 4 bis 6 unabhängigen Experimenten.

### 3.8.2 Die FLN-Phosphorylierung durch PKC $\alpha$ ist PIP<sub>2</sub> unabhängig

FLN lässt sich *in vitro* durch PKC $\alpha$  phosphorylieren (Kawamoto und Hidaka, 1984). Da sich die Bindung von PKC $\alpha$  an FLN als lipidabhängig erwiesen hatte, war es interessant herauszufinden, ob auch die PKC $\alpha$ -Phosphorylierung durch Phospholipid verstärkt würde. Da die Aktivität von PKC $\alpha$  immer abhängig von PS ist, stellte sich hier vor allem die Frage, ob eine Vorinkubation mit PIP<sub>2</sub> die *In-vitro*-Phosphorylierung von FLN durch PKC $\alpha$  verstärken kann. Für Vinculin konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die PIP<sub>2</sub>-Bindung wichtig für die Rate der PKC $\alpha$  Phosphorylierung ist (Ziegler et al., 2002).

Um eine mögliche PIP<sub>2</sub>-Abhängigkeit der FLN-Phosphorylierung durch PKC $\alpha$  zu untersuchen, wurde Putenmagen-FLN nach Inkubation mit einem 20fachen Überschuss an PIP<sub>2</sub>, in Gegenwart von [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP phosphoryliert. Die Kinasereaktion wurde vor dem Erreichen des Reaktionsendpunktes gestoppt. Phosphoryliertes FLN wurde via SDS-PAGE getrennt, auf NC-Membran geblottet und die [<sup>32</sup>P]Inkorporation wurde mittels Autoradiographie untersucht.



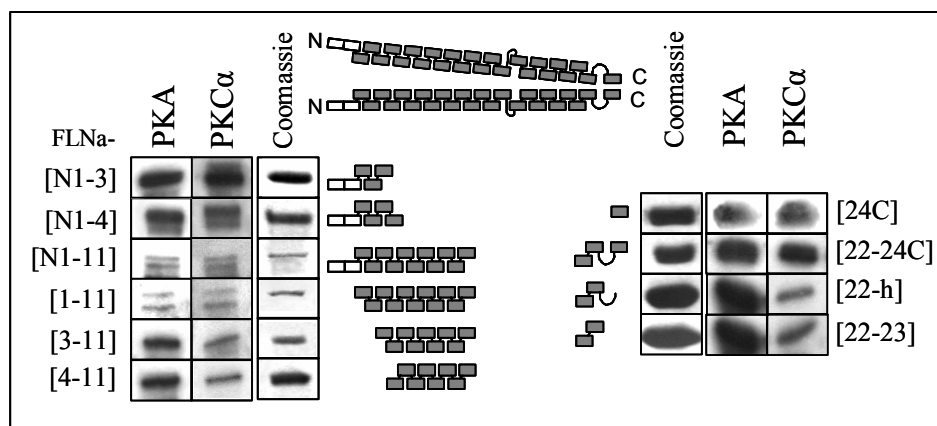
**Abb. III. 14: Untersuchung der Ko-Faktor-Abhängigkeit der In-vitro-FLN-Phosphorylierung durch PKC $\alpha$ .** Jeweils 20 pmol Putenmagen-FLN wurde entweder mit 0,5 nmol PIP<sub>2</sub> oder, als Negativkontrolle, mit einer entsprechenden Menge PBS inkubiert und danach wie unter 2.2.9 beschrieben mit PKC $\alpha$  in Gegenwart von [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP phosphoryliert. Die Ansätze wurden nach 30minütiger Inkubation (30 °C) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf NC-Membran geblottet. (A) Die [<sup>32</sup>P]Inkorporation wurde mittels Autoradiographie untersucht. (B) Bei 4 Kinaseassays wurde durch densitometrische Auswertung der Autoradiographien die Stärke der Phosphorylierung nach PIP<sub>2</sub>-Inkubation in Beziehung zur „normalen“ Aktivierung der PKC $\alpha$  gesetzt. Die [<sup>32</sup>P]Inkorporation bei „normaler“ Aktivierung wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Der Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler von 4 unabhängigen Experimenten.

Im Unterschied zur Phosphorylierung nach normaler Aktivierung der PKC $\alpha$  mit PS, Calcium und TPA hatte eine vorherige, zusätzliche Inkubation von FLN mit PIP<sub>2</sub> keinen deutlichen Einfluss auf die Phosphorylierung (Abb. III. 14). Wenn überhaupt, so war die FLN-Phosphorylierung in Gegenwart von PIP<sub>2</sub> leicht geschwächt. Eine Verstärkung der Phosphorylierung konnte in keinem Fall beobachtet werden.

### 3.8.3 Sowohl N- als auch C-terminale FLNa-Deletionsfragmente lassen sich durch PKC $\alpha$ phosphorylieren

Sowohl die von Kawamoto und Mitarbeitern (Kawamoto und Hidaka, 1984) durchgeführte PKC $\alpha$ -Phosphorylierung, als auch die unter III.3.8.2 beschriebene, ist mit FLN aus Putenmagen durchgeführt worden. Wie bereits zuvor erwähnt, kann bei FLN aus Putenmagen nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine Mischung der Isoformen FLNa und FLNb handelt. Zwar konnte durch die In-vivo-Phosphorylierung (III.3.8.1) für den C-terminalen Bereich demonstriert werden, dass FLNa durch konventionelle PKC phosphoryliert wird. dennoch war es interessant, die vorhandenen FLNa-Fragmente, mit PKC $\alpha$  zu phosphorylieren. Zum einen um zu bestätigen, dass PKC $\alpha$  in vitro wirklich die Isoform FLNa phosphoryliert, zum anderen aber auch, um herauszufinden, ob die PKC $\alpha$ -Phosphorylierung der Deletionsfragmente Hinweise bezüglich der FLNa-Regionen geben würde, die durch PKC $\alpha$  phosphoryliert werden.

Der Kinaseassay wurde wie unter III.2.2.9 beschrieben durchgeführt (Abb. III. 15). Als Kontrolle wurde jedes Fragment auch mit der katalytischen Untereinheit der PKA (cAMP-dependent protein kinase) phosphoryliert (III.2.2.10).



**Abb. III. 15: PKC $\alpha$ - und PKA-In-vitro-Phosphorylierung rekombinanter FLNa-Deletionsfragmente.** Rekombinant aufgereinigte FLNa-Deletionsfragmente, jeweils 100 pmol,

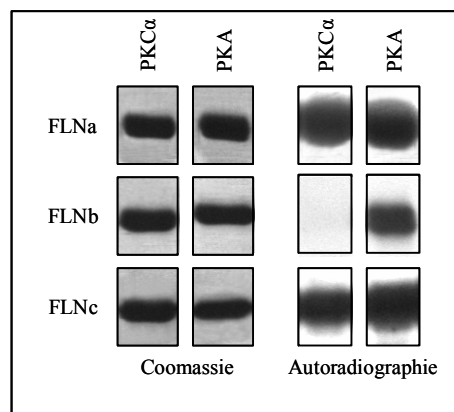
wurden in Gegenwart von [ $^{32}\text{P}$ ]- $\gamma$ -ATP mit PKC $\alpha$  oder PKA phosphoryliert. Die Kinasereaktionen wurden nach 60 Minuten Inkubation bei 30 °C durch Aufkochen in Probenpuffer gestoppt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und auf NC-Membranen geblottet. Die [ $^{32}\text{P}$ ]Inkorporation wurde mit Hilfe von Autoradiographien untersucht. Um die Proteinmengen und den Abbau der Fragmente abzuschätzen, wurden jeweils 100 pmol der Fragmente mittels PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie-Blau gefärbt.

Alle Fragmente ließen sich sowohl durch die PKC $\alpha$  als auch durch die katalytische Untereinheit der PKA phosphorylieren. N-terminal war die Untersuchung der Phosphorylierung der beiden längsten Deletionsfragmente (FLNa-N1-11 und -1-11) problematisch, da sie sehr stark dem Abbau unterworfen waren. Die Coomassie-Blau-Färbung der FLNa-Fragmente zeigt, dass bei den Fragmenten FLNa-N1-11 und -1-11, im Vergleich zu den anderen Fragmenten, die eingesetzte Proteinmenge deutlich geringer war. Berücksichtigt man dies aber und vergleicht nur die Stärke der PKA- mit der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung, so fällt auf, dass N- terminal, wie auch C-terminal, genau die Fragmente sich schwächer durch PKC $\alpha$  phosphorylieren lassen, die auch in den Dot-Overlay-Experimenten schwächer an PKC $\alpha$  gebunden haben (siehe III.3.6). Schlussfolgerungen bezüglich der Lokalisation der Phosphorylierungsstellen sind somit nicht einwandfrei möglich.

#### 3.8.4 C-terminale Fragmente von FLNa und FLNc lassen sich mit PKC $\alpha$ in vitro phosphorylieren, FLNb nicht

Die PKC $\alpha$ -Phosphorylierung des FLNa-C-Terminus ist eine Interaktion in einer interessanten FLN-Region: Nicht nur die Dimerisierung findet hier statt, sondern auch die Spaltung von FLN durch Calpain, des weiteren eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen (Stossel et al., 2001). Dass diese Region durch PKC $\alpha$  in vivo und in vitro phosphoryliert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden (siehe III.3.8.1 und III.3.8.3). Es erschien interessant, die In-vitro-Phosphorylierung für diesen wichtigen Bereich auch mit den anderen FLN-Isoformen zu untersuchen.

C-terminale Fragmente von FLNb und FLNc, welche jeweils den 23. Ig-Repeat, die hinge2 Region und den 24. Ig-Repeat umfassten, wurden freundlicherweise von Prof. Dieter Fürst zur Verfügung gestellt. Nachdem die Fragmente jeweils noch mit einem FLAG-tag versehen worden waren, wurden mit ihrer Hilfe FLNc- und FLNb-Deletionsfragmente in *E. coli* exprimiert und mittels Ni-NTA-Sepharose aufgereinigt. Die Proteine wurden jeweils wie zuvor beschrieben mit PKC $\alpha$  und mit der katalytischen Untereinheit der PKA in Gegenwart von [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP phosphoryliert.



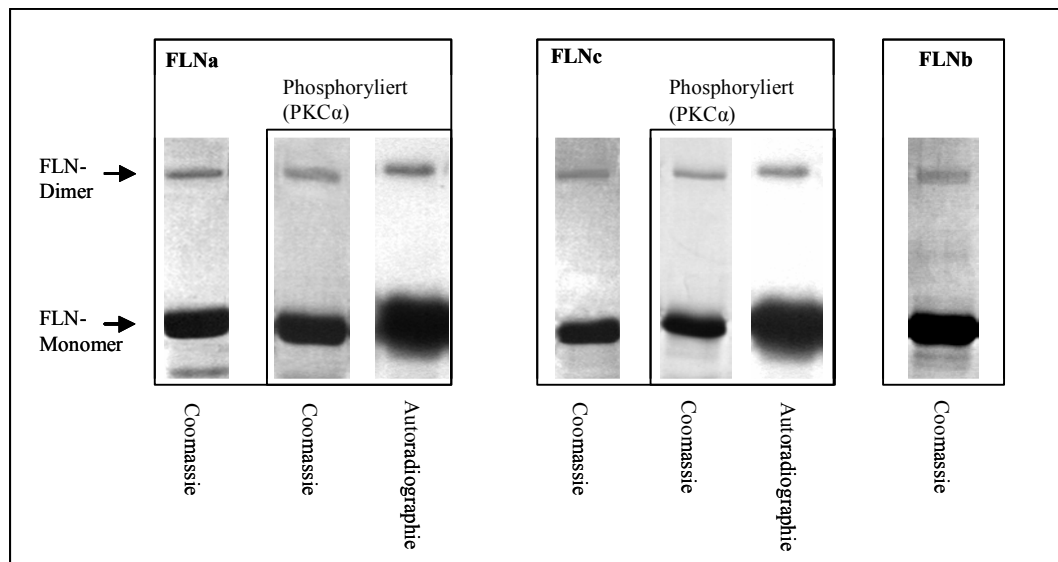
**Abb. III. 16: In-vitro-Phosphorylierung C-terminaler FLNa-, FLNb- und FLNc-Deletionsfragmente.** FLNa-, FLNb- und FLNc-Deletionsfragmente (Ig-Repeat 23, hinge2 Region und Ig-Repeat 24) wurden in *E. coli* exprimiert und mittels Ni-NTA-Sepharose aufgereinigt. Jeweils 100 pmol Fragment wurden dann in Gegenwart von [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP mit PKC $\alpha$  und PKA phosphoryliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden nach Coomassie-Blau-Färbung getrocknet und die [ $^{32}$ P]Inkorporation wurde mit Hilfe von Autoradiographien nachgewiesen. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 durchgeführte Versuche.

Die Kinaseassays mit den FLN-Isoformen a, b und c ergaben, dass FLNb als einzige Isoform sich zwar durch PKA, aber nicht durch PKC $\alpha$  phosphorylieren lässt.

### 3.8.5 Einfluss der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung auf die Dimerisierung von FLN

Um herauszufinden, welche Bedeutung die PKC $\alpha$ -Phosphorylierung im C-terminalen Bereich von FLN haben könnte, war es von Interesse, die mit dem C-terminalen Bereich verbundenen FLN-Funktionen zu untersuchen. Das ist zunächst einmal die Dimerisierung von FLN. Dass FLN für seine Aktin-vernetzende Funktion als Dimer vorliegen muss, ist seit Anfang der 80er Jahre bekannt (Davies et al., 1980). Dass der 24. Ig-Repeat die Dimerisierung vermittelt, wurde direkt oder indirekt von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt (Gorlin et al., 1990; Himmel et al., 2003; Weihing, 1988). Wie die Dimerisierung reguliert wird, ist bis heute nicht geklärt.

Um zu untersuchen, inwieweit eine Phosphorylierung des FLN-C-Terminus durch PKC $\alpha$  die Dimerisierung beeinflussen kann, wurde ein Dimerisierungs-Assay genutzt, bei dem mit [ $^{32}$ P]Phosphat phosphorylierte oder nicht phosphorylierte C-terminale FLN-Deletionsfragmente in Gegenwart eines Quervernetzers (DSS) inkubiert wurden. Es ist durch hohe Konzentrationen an Quervernetzer möglich, FLN vollständig zu Dimeren zu vernetzen (Himmel et al., 2003). Eine vollständige Vernetzung wäre aber ungeeignet, um den Einfluss der Phosphorylierung auf die Dimerisierung einzuschätzen. Es wurden also Quervernetzer-Konzentrationen gewählt, bei denen nur ein Teil des FLN vernetzt wurde. Nach der Inkubation mit dem Quervernetzer wurde das monomere oder dimere FLN mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinmengen, die jeweils vernetzt als Dimer oder unvernetzt als Monomer vorlagen, wurden durch Coomassie-Blau-Färbung ermittelt, die Verteilung der Radioaktivität auf die Mono- und Dimere wurde nach Trocknung der Gele durch Autoradiographie nachgewiesen.



**Abb. III. 17: Einfluss der Phosphorylierung auf die Dimerisierung von C-terminalen FLN-Deletionsfragmenten.** Jeweils 100 pmol FLNa- und FLNc-Deletionsfragment (23-24C) wurden mit PKCα in Gegenwart von [<sup>32</sup>P]-γ-ATP phosphoryliert. Die Kontrollen wurden jeweils ohne PKCα durchgeführt. Nach 30minütiger Inkubation bei 30 °C wurde, wie unter 2.2.13 beschrieben, die Quervernetzung mit DSS gestartet. Nach erneuter Inkubation für 30 Minute bei 37 °C wurde die Reaktion durch Präzipitation mit Chloroform/Methanol gestoppt. Präzipitiertes Protein wurde in Probenpuffer aufgekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden Coomassie-Blau gefärbt und die [<sup>32</sup>P]Inkorporation wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen. FLNb wurde als Kontrolle unphosphoryliert quervernetzt und ansonsten wie FLNa oder FLNc behandelt. Die Abbildung zeigt mono- und dimeres FLNa, FLNc und FLNb, die Coomassie-Blau-Färbung von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Protein und die Autoradiographie des phosphorylierten Proteins.

Wie in der Abb. 17 zu erkennen ist, hatte die PKCα-Phosphorylierung keinen deutlichen Einfluss auf die FLN-Dimerisierung. Eine Mengenverschiebung zwischen FLN-Mono- und -Dimer, die in einem Coomassie-Blau-gefärbten Gel zu sehen ist, wäre nur bei einer starken Phosphorylierungsrate zu erwarten. Aber auch in dem Fall, dass nur wenige Prozent des Gesamtproteins phosphoryliert vorliegen, sollte die Verteilung des [<sup>32</sup>P]-Phosphat auf die Mono- und Dimer-Banden, nicht einfach nur die Verteilung des Gesamtproteins widerspiegeln. Betrachtet man die Autoradiographien, scheint allerdings genau dies der Fall zu sein. Auch eine Quantifizierung und statistische Auswertung von 3 unabhängigen Versuchen demonstrierte lediglich, dass unter den gewählten Bedingungen kein signifikanter Einfluss der PKCα- oder PKA-Phosphorylierung auf die Dimerisierung von FLNa oder FLNc festgestellt werden konnte.

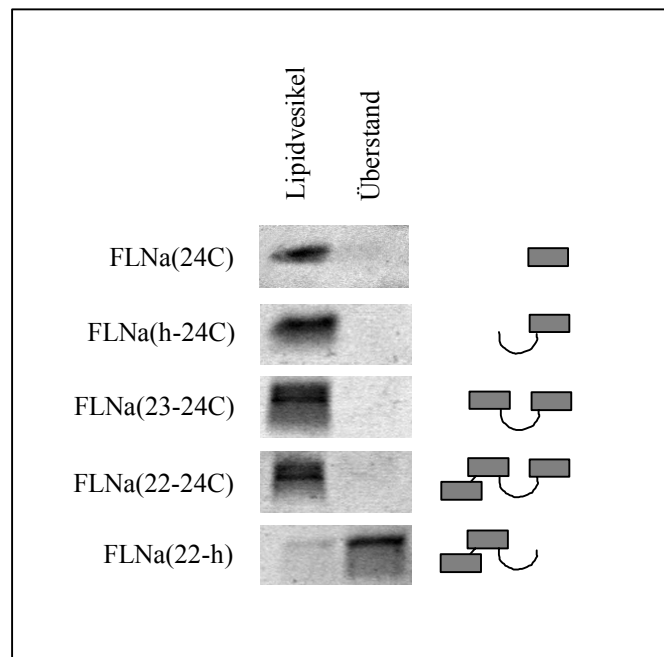
### 3.8.6 Einfluss der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung auf die Lipidbindung von FLN

Dass FLNa an saure Phospholipide binden kann, konnte durch Computeranalysen vorausgesagt (Tempel et al., 1994b) und schließlich durch die Anwendung verschiedener Techniken in vitro gezeigt werden (Tempel et al., 1994a). Der für die Lipid-Bindung vorausgesagte und dann bestätigte Sequenzabschnitt des FLN Proteins liegt im N-terminalen Bereich, der auch für die Aktinbindung verantwortlich ist. Für den FLNa-C-Terminus gibt es bisher keine publizierten Voraussagen oder Untersuchungen, die zeigen, dass er an saure Phospholipide bindet. Dennoch war die Bindung von PKC $\alpha$  sowohl für den N-terminaler gelegenen, als auch für den C-terminalen FLNa-Bindungsbereich deutlich Lipid-abhängig. Es stellte sich also die Frage, ob FLNa wirklich nur N-terminal an Phospholipide bindet. Mit Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown-Versuchen (SLV-Pulldown) war es dann tatsächlich möglich, zu demonstrieren, dass der 24. Ig-Repeat von rekombinant aufgereinigtem FLNa an saure Phospholipide bindet.

Das Prinzip des Saccharose-Lipidvesikel-Pulldowns ist, dass große unilamellare Vesikel hergestellt werden (siehe II.2.11). Da sich die Vesikel in saccharosehaltigem Puffer durch Einfrier- und Auftauschritte produzieren lassen, können sie, durch den Zucker beschwert, sobald sie in saccharosefreien Puffer eingewaschen sind, auch bei niedrigen g-Werten sedimentieren. Inkubiert man sie vor dem Zentrifugieren mit Proteinen, so lassen sich die Proteine, falls sie an die Vesikel binden, ko-sedimentieren.

C-terminale FLNa-Deletionsfragmente ließen sich mit Vesikeln ko-sedimentieren, die aus den Phospholipiden PC, PS und PIP<sub>2</sub> im Verhältnis 9 zu 9 zu 2 hergestellt worden waren. Wurden diese Versuche mit den verschiedenen FLNa-Deletionsfragmenten durchgeführt, zeigte sich, dass nur der 24. Ig-Repeat diese Bindung an Phospholipide vermittelte (Abb. III. 19).

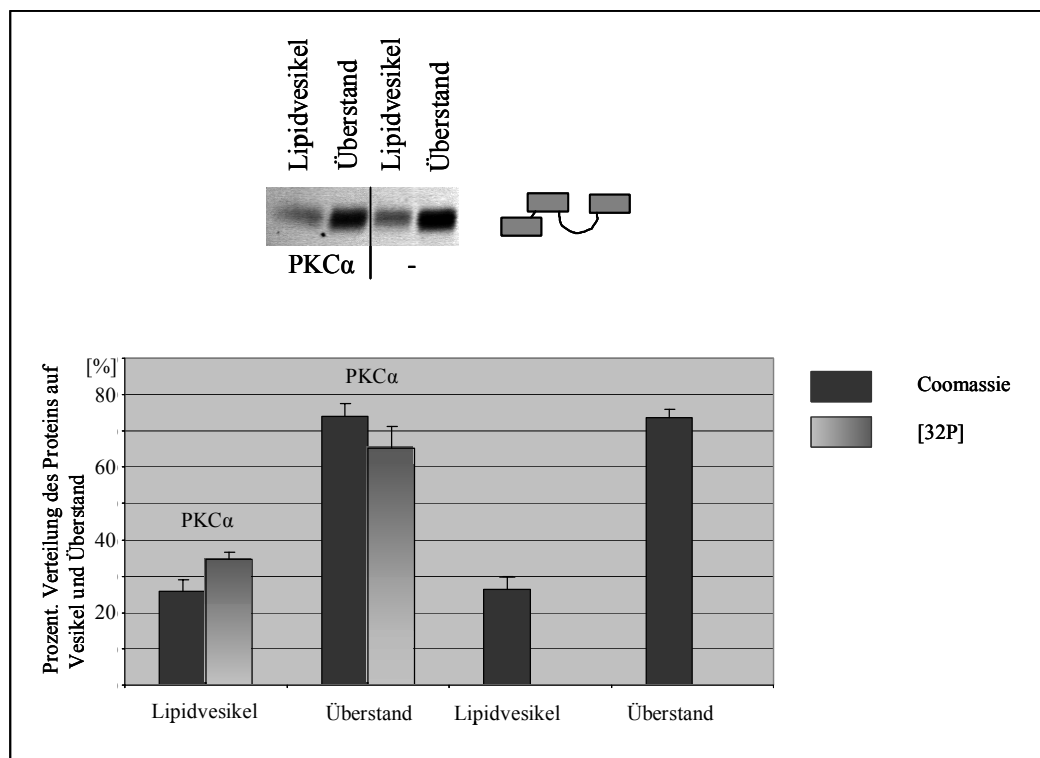




**Abb. III. 19: Eingrenzung des phospholipidbindenden Bereichs des FLNa-C-Terminus.** Jeweils 100 pmol aufgereinigte FLNa-Deletionsfragmente wurden mit Phospholipidvesikeln inkubiert, die aus 40  $\mu\text{mol}$  PC, PS und  $\text{PIP}_2$  im Verhältnis 9 zu 9 zu 2 bestanden. Nach der Inkubation wurden die Vesikel mit 15.000 x g sedimentiert und sowohl der Überstand als auch die sedimentierten Vesikel wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie-Blau gefärbt.

Um die Frage zu beantworten, ob die Lipidbindung des FLNa 24. Ig-Repeats durch eine Phosphorylierung mit  $\text{PKC}\alpha$  beeinflusst werden kann, wurde der oben beschriebene SLV-Pull Down mit FLNa-22-24C Deletionsfragmenten durchgeführt, die zuvor mit  $\text{PKC}\alpha$  in Gegenwart von  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$  phosphoryliert wurden. Problematisch ist dabei, dass die PS-Micellen, die für eine volle Aktivierung der  $\text{PKC}\alpha$  im Kinaseassay anwesend sein müssen, im SLV-Pull Down stören. Das FLNa-Deletionsfragment wurde daher nach der Phosphorylierung an Nickel-NTA-Sepharose gebunden, alle Kofaktoren des Kinaseassays wurden durch Waschen entfernt, das FLNa-Fragment wurde von der Ni—NTA-Sepharose eluiert, in den SLV-Puffer dialysiert und für die oben beschriebenen Pull Down Versuche verwendet. Da bei diesem modifizierten Assay die Proteinmengen, die am Ende für den SLV-Pull Down eingesetzt werden, nur abgeschätzt werden können – die Verluste an Protein während der Reinigung und Dialyse sind nicht leicht konstant zu halten – unterscheiden sich die Ergebnisse von den in Abb. 19 dargestellten. Eine fast 100prozentige Anreicherung, des zu untersuchenden Proteins im Vesikelsediment ist nur bei exakt eingestellten Protein/Lipid-Konzentrationen möglich. Erhöht man bei gleichbleibender Lipidmenge die Proteinkonzentration, so bleibt ein Teil des Proteins im Überstand. Dennoch ist auch bei diesem Versuch, wie schon zuvor bei den Kinase/DimerisierungsAssays, wieder die Frage von Interesse, wo das durch die Phosphorylierung mit  $^{32}\text{P}$  markierte Protein zu finden ist. Es

wurden also wieder mehrere Versuche densitometrisch und mit dem Phosphorimager ausgewertet.



**Abb. III. 20: Einfluss der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung auf die Phospholipidbindung des FLNa C-terminalen Bereichs.** Jeweils 800 pmol aufgereinigtes FLNa-22-24C Deletionsfragment wurde mit PKC $\alpha$  phosphoryliert und mit Hilfe von Ni-NTA-Sephrose, wie unter 2.2.12 beschrieben, von den Lipiden des Kinaseansatzes befreit. Das so behandelte Protein wurde wie zuvor beschrieben mit Phospholipidvesikeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Vesikel mit 15.000 x g sedimentiert und sowohl der Überstand als auch die sedimentierten Vesikel wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie-Blau gefärbt und densitometrisch ausgewertet und anschließend wurde mittels Phosphorimager die Verteilung des  $^{32}\text{P}$  auf Vesikelsediment und Überstand quantifiziert. In der Kontrolle wurde, bei ansonsten gleicher Behandlung, im Kinaseansatz keine PKC $\alpha$  zugegeben. (A): Repräsentatives, Coomassie-Blau-gefärbtes Gel. (B) Die Graphik zeigt die densitometrische- und die Phosphorimagerauswertung von 4 Versuchen.

Wie in der Abb. 20 zu sehen ist, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gesamtverteilung des FLNa Fragments zwischen Vesikelsediment und Überstand und der Verteilung des mit  $^{32}\text{P}$ -markierten Proteins. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Phosphorylierung durch PKC $\alpha$  keinen Einfluss auf die Lipidbindung des FLNa 24. Ig-Repeats hat.

## **IV. Diskussion**

Eine grundlegende Bedeutung der Proteinkinase C (PKC) für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts konnte in einer Vielzahl von Arbeiten demonstriert werden (siehe I.1.3). Beispielsweise führt in einigen Zelltypen eine PKC-Inhibition dosisabhängig zu einer verminderten Ausbildung von fokalen Kontakten und Stressfasern. Eine PKC-Aktivierung durch Phorbol ester verursacht in den gleichen Zellen die Ausbildung fokaler Kontakte unter Bedingungen, unter denen sie normalerweise nicht ausgebildet werden (Woods und Couchman, 1992).

PKC $\alpha$  war der erste PKC-Isotyp für den eine Lokalisation in fokalen Kontakten nachgewiesen werden konnte (Jaken et al., 1989). Mittlerweile wurden die Interaktionen verschiedener PKC-Isotypen mit diversen Zytoskelett-Proteinen untersucht (Jaken und Parker, 2000). Durch die Komplexität zytoskelettärer Strukturen ist aber ein detailliertes Verständnis darüber, wie PKC die Organisation des Zytoskeletts beeinflusst, nach wie vor nicht vorhanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels des Yeast-two-hybrid-Systems nach Zytoskelett-assoziierten Interaktionspartnern für PKC $\alpha$  gesucht. Filamin wurde als Bindungspartner identifiziert. Die Filamin-PKC $\alpha$ -Interaktion wurde unter physiologischen Bedingungen bestätigt und biochemisch charakterisiert. Ferner konnte eine In-vivo-Phosphorylierung von Filamin durch konventionelle PKC gezeigt werden.

### **1 Filamin bindet im Yeast-two-hybrid-System an PKC $\alpha$ . Die Interaktion lässt sich mit weiteren In-vitro- und In-vivo-Systemen bestätigen**

Zwei unterschiedliche Abschnitte des Zytoskelett-assoziierten Proteins Filamin wurde im Yeast-two-hybrid-System als Bindungspartner für PKC $\alpha$  identifiziert.

Eine funktionelle Beziehung zwischen PKC $\alpha$  und Filamin ist schon von einigen Autoren postuliert worden (Stossel et al., 2001; Glogauer et al., 1998; Ohta und Hartwig, 1996). Eine grundlegende Untersuchung der Interaktion ist dagegen noch nicht durchgeführt worden. Lediglich die In-vitro-Phosphorylierung von FLN durch PKC $\alpha$  war im Rahmen einer Untersuchung zur PKC $\alpha$ -Phosphorylierbarkeit verschiedener zytoskelettärer Proteine gezeigt worden (Kawamoto und Hidaka, 1984). In vielen Zelltypen wie Fibroblasten, Epithelzellen oder Blutplättchen (Langanger et al., 1984; Stossel et al., 2001) findet man Filamin vor allem

im Bereich des kortikalen Aktinnetzwerks (Stossel et al., 2001). Über die Interaktion mit Integrinen oder Integrin-Ko-Rezeptoren wird Filamin aber auch in fokale Kontakte eingebaut (Nikki et al., 2002; Zamir und Geiger, 2001). PKC $\alpha$  und Filamin ko-lokalisieren also in Zellen, wenn cytoplasmatische PKC $\alpha$  nach Aktivierung an verschiedene Bereiche der Membran transloziert (Jaken und Parker, 2000).

Die Interaktionen der identifizierten Filamin-Fragmente mit PKC $\alpha$  im Yeast-two-hybrid-System waren schwach. Eine Blaufärbung im X-Gal-Test (siehe III.1.3) war erst nach ca. 6 Stunden beobachtbar. Dies ist problematisch, da nach ca. 6 bis 8 Stunden X-Gal-Entwicklung verstärkt unspezifische Signale auftreten. Erkennbar ist dies daran, dass nach dieser Zeit häufig alle angewachsenen Hefekolonien eine leichte Blaufärbung aufweisen. Eine starke Interaktion im Yeast-two-hybrid-System würde andererseits der Erfahrung widersprechen, dass Kinasen meist nur transient mit Wechselwirkungspartnern interagieren (Jaken und Parker, 2000).

Um sicherzustellen, dass es sich bei der PKC $\alpha$ -Filamin-Interaktion nicht um ein Artefakt des Yeast-two-hybrid-Systems handelt, wurde bei allen Versuchen sehr genau darauf geachtet, dass die X-Gal-Blaufärbung stets vor einer „allgemeinen“ Hintergrundblaufärbung auftrat. Für die Spezifität der PKC $\alpha$ -Filamin-Interaktion spricht ferner, dass in den Yeast-two-hybrid-Untersuchungen neben Filamin auch zwei LIM-Domänen-Proteine nachgewiesen wurden (siehe III.1.3). LIM-Proteine sind bekannte Interaktionspartner der PKC. Ihre Interaktion wurde nach Yeast-two-hybrid-Analysen mit verschiedenen Methoden bestätigt (Kuroda et al., 1996). Es schien also lohnenswert, die PKC $\alpha$ -Filamin-Interaktionen mit weiteren Methoden zu überprüfen.

Mit Hilfe von Ko-Immunpräzipitationen nach In-situ-Quervernetzung konnte gezeigt werden, dass PKC $\alpha$  und Filamin-Fragmente in HeLa-Zellen gemeinsam in Proteinkomplexen zu finden sind (siehe III.2). Die Kombination von Ko-Immunpräzipitation und In-situ-Quervernetzung ist eine etablierte Methode, um unter physiologischen Bedingungen Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen (Hinck et al. 1994; Huttelmaier et al., 1998). Es kann bei dieser Methode jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die nachgewiesene Interaktion der beiden transfizierten Proteine im Cytosol stattfand. Dies würde sehr wahrscheinlich keine physiologische Situation widerspiegeln, da cytosolische PKC nicht aktiv ist (Mellor und Parker, 1998; Newton, 1997) und Filamin unter physiologischen Bedingungen im Cytosol nicht in nennenswerten Konzentrationen vorliegt (Stahlhut und van Deurs, 2000). Die deutliche Lipidabhängigkeit der Bindung (siehe III.3.4 und 3.5) lässt aber vermuten, dass die

aus HeLa-Zellen isolierten Filamin-PKC $\alpha$ -Komplexe vorwiegend an der Plasmamembran gebildet wurden. Die Ko-Immunpräzipitationsversuche mit den C-terminalen FLNc-Fragmenten ließen sich auch mit C-terminalen FLNa-Fragmenten reproduzieren.

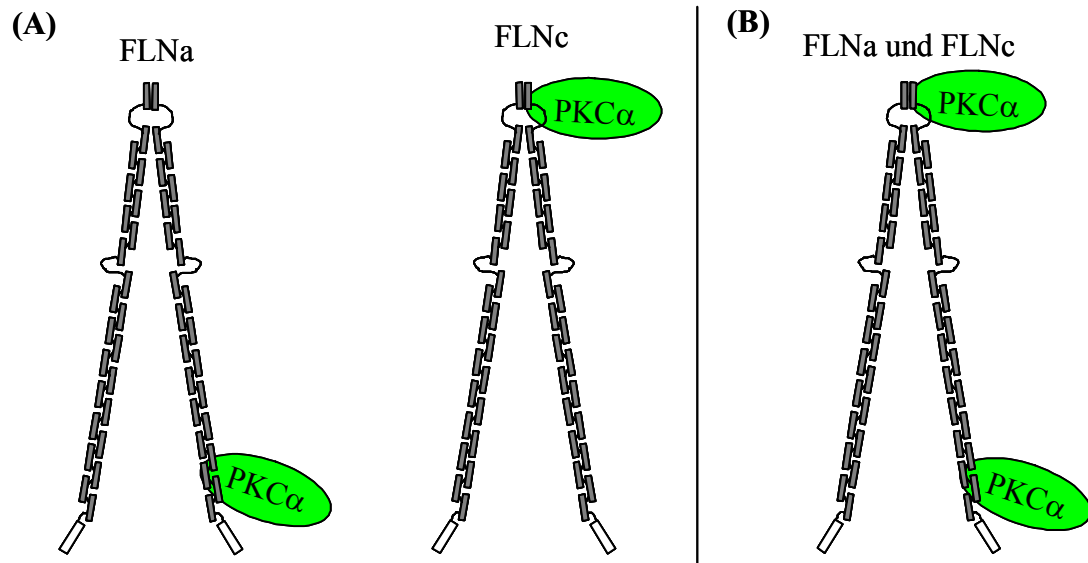
Bemerkenswert an den Ergebnissen der Ko-Immunpräzipitation ist, dass keine zusätzliche Aktivierung der PKC $\alpha$  nötig war. Tatsächlich lassen sich viele zytoskelettäre PKC-Interaktionspartner gar nicht gemeinsam mit PKC ko-immunpräzipitieren (Jaken und Parker, 2000); andere, wie Vinculin, müssen zuvor aktiviert werden (Ziegler et al., 2002). Allerdings gibt es auch Beispiele für PKC-Interaktionen, für die keine generelle Aktivierung der cytosolischen PKC nötig ist. Die Phosphoinositid-Abhängige Proteinkinase (PDK) phosphoryliert PKC an der Membran, was weitere Phosphorylierungen initiiert und so zu einer Überführung der PKC in eine latent aktive Form führt. Damit die PDK-PKC-Interaktion stattfinden kann, müssen die Zellen lediglich adherent sein (Parekh et al., 2000). In ähnlicher Weise könnte auch die Filamin-PKC $\alpha$ -Interaktion durch normale Zellkulturbedingung induziert werden.

Da nach In-situ-Quervernetzung oft große Proteinaggregate entstehen, ist diese Methode nicht geeignet, um direkte Protein-Protein-Bindungen nachzuweisen. Ob Proteine direkt miteinander interagieren, kann durch biochemische Bindungsstudien untersucht werden. Die direkte Filamin-PKC $\alpha$  Interaktion ließ sich biochemisch durch Dot overlay-Untersuchungen sowohl mit aufgereinigtem Putenmagen Filamin, als auch mit rekombinantem Filamin (FLNa) nachweisen (siehe III.3).

Ein weiteres starkes Argument für die Validität der Filamin-PKC $\alpha$ -Interaktion konnte dadurch erbracht werden, dass sowohl endogenes, als auch exogenes Filamin in vivo durch PKC $\alpha$  phosphoryliert wird (siehe III.3.8.1).

## **2 FLNa und FLNc interagieren mit PKC $\alpha$**

In den durchgeführten Yeast-two-hybrid-Suchen waren insgesamt drei Filamin Sequenzen gefunden worden: ein FLNa-Fragment konnte in der Embryo-cDNA-Bank und zwei FLNc-Fragmente konnten in der Herz-cDNA-Bank identifiziert werden (siehe III.1.3). Die gefundenen Fragmente umfassten dabei die Ig-Repeats 4 bis 10 in FLNa und 20 bis 24 in FLNc (siehe III.1.4). Es stellte sich die Frage, ob PKC $\alpha$  mit beiden FLN-Isoformen interagiert und dabei jeweils an unterschiedliche Regionen von FLNa und FLNc bindet, oder ob es in beiden Filamin-Isoformen zwei Bindungsregionen für PKC $\alpha$  gibt (Abb.IV.1). Die FLNc-Konstrukte wurden als mögliche Interaktionspartner in einer Herz-cDNA-Bank gefunden. FLNc ist die prädominante Filamin-Isoform im Herzmuskel (Koteliansky et al., 1981; Stossel et al., 2001). Welche FLN-Isoformen in den Yeast-two-hybrid-Versuchen gefunden wurden, hängt wahrscheinlich davon ab, mit welcher cDNA-Bank gearbeitet wurde. Hierfür spricht auch, dass die Homologie zwischen FLNa und FLNc im C-terminalen Bereich mit 75 bis 76 % sehr hoch ist (siehe III.1.4). Allerdings war in einem der identifizierten FLNc-Fragmente etwa die Hälfte des FLNc-spezifischen Einschubs vorhanden. FLNc besitzt als einzige Filamin-Isoform im 20. Ig-Repeat einen ca. 80 Aminosäuren langen Einschub, von dem vermutet wird, dass er spezifische Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Xie et al., 1998). Das erwähnte Fragment, das einen Teil des 20. Ig-Repeat umfasste, ließ sich jedoch als einziges in den Ko-Immunpräzipitationsversuchen nicht als Ligand für PKC $\alpha$  bestätigen (siehe III.2). Versuche zur Lokalisation des PKC $\alpha$ -Filamin-Interaktionsbereichs (siehe III.11) zeigten zudem, dass für die Interaktion nur die hinge2-Region und der Ig-Repeat 24 nötig sind. Der spezifische FLNc-Einschub im 20. Ig-Repeat hat also keinen Anteil an der PKC $\alpha$ -FLN-Bindung.



**Abb.IV.1 Schematische Darstellung der möglichen PKC $\alpha$ -Interaktionen mit den Filamin-Isoformen FLNa und FLNc.** (A) Die Yeast-two-hybrid-Daten deuten darauf hin, dass PKC $\alpha$  mit unterschiedlichen Regionen von FLNa und FLNc interagiert. Für FLNa wurde eine N-terminal und für FLNc eine C-terminal gelegene Region identifiziert. (B) Die weitere Charakterisierung der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion demonstriert, dass PKC $\alpha$  mit FLNa über beide beschriebenen Regionen interagiert. Eine PKC $\alpha$ -Interaktion mit der C-terminal gelegenen FLNc-Region wurde nicht untersucht, die hohe Sequenzhomologie zwischen der FLNa- und FLNc-Isoform im C-terminalen Bereich, lassen eine solche Interaktion wahrscheinlich erscheinen.

Durch die ubiquitäre Expression von FLNa, im Gegensatz zur zelltypspezifischen von FLNc, war die Frage nach dem „Wo“ der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion besonders interessant. Wäre die PKC $\alpha$  Interaktion mit dem Filamin-C-Terminus auf das muskelspezifische FLNc beschränkt, wäre die Bedeutung der Interaktion in dieser Region vermutlich in spezifischen Funktionen des Muskels zu suchen. Eine Interaktion mit dem ubiquitären FLNa könnte dagegen von genereller Bedeutung für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts sein. Die biochemischen Charakterisierungen der PKC $\alpha$ -Interaktion mit FLNa zeigen allerdings deutlich, dass PKC $\alpha$  an beide identifizierten Filamin-Regionen bindet.

Es erscheint darüber hinaus wahrscheinlich, dass PKC $\alpha$  auch mit der dritten Isoform FLNc interagiert. Beide Filamin-Isoformen lassen sich C-terminal *in vitro* durch PKC $\alpha$  phosphorylieren (siehe III.3.8.4). Eine Ko-Präzipitation nach *In-situ*-Quervernetzung ließ sich sowohl mit C-terminalen FLNc-, als auch mit FLNa-Fragmente durchführen (siehe III.2). Zudem wird FLNc über seine Interaktion mit Sarcoglycanen an die Plasmamembran von Muskelzellen lokalisiert (Thompson et al., 2000); sollte also ebenso wie FLNa in der Zelle auf PKC $\alpha$  treffen.

### **3 PKC $\alpha$ bindet FLNa in der Nähe funktionell wichtiger Domänen**

Ein Problem bei der Eingrenzung der FLNa-Bindungsregion für PKC $\alpha$  bestand darin, dass nach der Deletion von ganzen FLN-Ig-Repeats die resultierenden Fragmente teilweise unerwartete Bindungseigenschaften aufweisen. So war die PKC $\alpha$ -Bindung an einige Deletionsfragmente deutlich stärker als an andere, obwohl die Fragmente alle die PKC $\alpha$ -Bindungsregion umfassten (siehe III.3.6). Möglicherweise entstehen durch die Deletionen offene Enden, die im Wildtyp-Protein nicht existieren. Durch die postulierte Verschachtelung der Ig-Repeats (Gorlin et al., 1990), wie sie für Dictyostelium-Filamin auch mit Röntgenstrukturanalysen bestätigt werden konnten (Fucini et al., 1997), werden ganze Bereiche der Ig-Repeats verdeckt. Ihre Offenlegung kann die Bindungseigenschaften des Proteins modifizieren. Im Labor von A. Sonnenberg konnte gezeigt werden, dass eine Offenlegung von Ig-Repeats die Bindungseigenschaften von Filamin-Isoformen nicht nur verändern kann, sondern dass dies für die Funktion der Zelle vermutlich auch von Bedeutung ist: FLNa und FLNb Splicevarianten, denen ein Teil des Ig-Repeats 20 fehlt, binden an verschiedene Integrine, an die die FLN-Isoformen mit vollständigem Ig-Repeat 20 nicht binden können. Für die Vermutung, dass in der verkürzten Splicevariante Bereiche des 20. oder des benachbarten 21. Ig-Repeats offengelegt sind und dass dies die Integrinbindung vermittelt, spricht, dass auch deletierte FLN-Fragmente, die nur noch aus einem Teil des 20. und den folgenden C-terminalen Ig-Repeats bestehen, an die gleichen Integrine wie die FLN-Splicevarianten binden (van der Flier et al., 2002).

Die statistische Auswertung der Bindungsversuche liefert dann aber Ergebnisse, die deutlich demonstrieren, dass die FLNa-PKC $\alpha$ -Bindung N-terminal durch die Ig-Repeats 1 und 2 und C-terminal, wie bereits erwähnt, durch den Ig-Repeat 24 und die hinge2-Region vermittelt wird (siehe III.3.6).

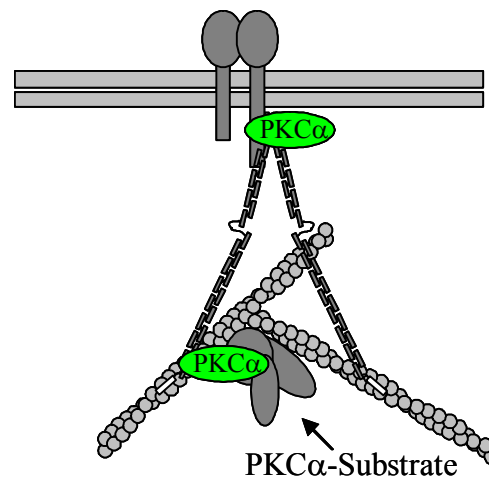
Somit bindet PKC $\alpha$  jeweils in der Nähe funktionell wichtiger FLN-Regionen. N-terminal ist die Bindungsregion in der direkten Nachbarschaft der F-Aktin-bindenden Domäne. Diese besteht aus 2 Calponin-homology-Domänen (CH-Domänen) des Typs 1 und 2. Die CH-Domänen vermitteln außer der F-Aktin-Bindung auch die Bindung an saure Phospholipide (Gimona et al., 2002; Goldmann et al., 1999). Andererseits inhibiert die Bindung saurer Phospholipide an diese Region wiederum die Filamin-vermittelte F-Aktin-Vernetzung (Furuhashi et al., 1992).

Die Bindungsversuche demonstrieren deutlich, dass die F-Aktin-Bindungsregion nicht an der PKC $\alpha$ -Interaktion beteiligt ist (siehe III.3.6). Interessanter Weise konnte für Calponin-Typ 3-CH-Domänen eine lipidabhängige PKC $\alpha$ -Interaktion nachgewiesen werden (Leinweber et al.,



2000). Dass die FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion deutlich nicht über die Typ1/2 CH-Domänen vermittelt wird, bestätigt Versuche, die funktionelle Unterschiede zwischen Typ1/2 und Typ 3 CH-Domänen demonstrieren. CH-Domänen des Typs 3 können beispielsweise nicht wie die des Typs1/2 an F-Aktin binden (Gimona und Mital, 1998), auch sind für Typ3 CH-Domänen andere Protein-Interaktionspartner beschrieben, als für die Typ 1/2 CH-Domänen (vgl. Korenbaum und Rivero, 2002). Dass PKC $\alpha$  nah genug an den CH-Domänen bindet, um die F-Aktin- und Lipidbindung direkt zu beeinflussen, erscheint nicht wahrscheinlich: Mindestens 122 bzw. 130 Aminosäuren trennen den N-terminalen FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktionsbereich von den Lipid- bzw. Aktin-interagierenden Aminosäuren der Filamin-CH-Domänen (vgl. Goldmann et al., 1999; Lebart et al., 1994). Für die beiden Funktionen wurde bereits die Bedeutung anderer Kinasen untersucht. Die Filamin-Aktin-Bindung wird eventuell durch die CaM-KinaseII reguliert. In vitro inhibiert die Filamin-Phosphorylierung durch diese Kinase die Filamin-Aktin-Bindung (Ohta und Hartwig, 1995). Ein Einfluss der p56(lck)-Kinase auf die Lipidbindung der Filamin-CH-Domänen wird postuliert (Goldmann, 2002). Die Interaktionen der beiden Kinasen mit Filamin sind in vivo noch nicht bestätigt worden. Ob PKC $\alpha$  indirekt die Funktionen der CH-Domänen beeinflusst, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen. Berücksichtigt man die hohe Komplexität des Aktin-Zytoskeletts mit seinen diversen Aktin-assoziierten Proteinen, so könnte FLNa der PKC $\alpha$  über die N-terminale Bindungsregion vor allem auch als Gerüstprotein dienen. PKC $\alpha$  könnte an FLNa binden und mit anderen Proteinen interagieren, die an F-Aktin oder an die FLNa-CH-Domänen binden (Abb.IV.2)

Das gleiche gilt für den C-terminalen FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktionsbereich. Durch die Bindung an den 24. Ig-Repeat und die hinge2-Region interagiert PKC $\alpha$  C-terminal mit der FLNa Region, für die bis heute die meisten Interaktionen beschrieben sind (Stossel et al., 2001). Viele der hier bindenden Proteine sind Proteine der Signaltransduktion. Dazu gehören sowohl kleine GTPasen der Rho-Familie (Ohta et al., 1999), der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Trio (Bellanger et al., 2000), Smads (Sasaki et al., 2001) und andere Kinasen wie die p21-aktivierte Kinase 1 (PAK1) (Vadlamudi et al., 2002). Die auffällige Konzentration von Filamin-Protein-Interaktionen in diesem Bereich hat bereits verschiedentlich zu der Vermutung geführt, dass Filamin eine Gerüst-Funktion hat und eine Schnittstelle für verschiedene Signaltransduktionswege sein könnte (Stossel et al., 2001). So könnte auch die C-terminale FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion vor allem die Bedeutung haben, PKC $\alpha$  mit weiteren Zytoskelett-assoziierten Liganden in Kontakt zu bringen (Abb.IV.2).



**Abb.IV.2 Schematische Darstellung einer möglichen FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion.** Die PKC $\alpha$  Bindung nahe der FLNa-F-Aktin-Bindungsregion und direkt an den FLNa-C-terminalen-Bereich könnte PKC $\alpha$  in die Nähe weiterer zytoskelettärer Substratproteine bringen.

Die C-terminale FLNa-PKC $\alpha$ -Bindungsregion ist aber im Gegensatz zur N-terminal gelegenen nicht in der Nähe einer funktionell wichtigen Region von FLN, sondern PKC $\alpha$  bindet in diesem Fall direkt an einen Bereich, der von zentraler Bedeutung für die Funktion Filamins ist: Der 24. Ig-Repeat vermittelt die FLN-Dimerisierung und ist damit essentiell für die Fähigkeit von Filamin Aktin-Fasern zu vernetzen (Li et al., 1999). Die Frage nach dem Einfluss von PKC $\alpha$  auf C-terminal vermittelte Funktionen Filamins, werden unter IV.6 gesondert diskutiert.

#### **4 Die FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion ist Ko-Faktor-abhängig**

Die biochemischen Untersuchungen (siehe III.3.4) demonstrierten deutlich, dass die Interaktion zwischen FLNa und PKC $\alpha$  an beiden identifizierten Bindungsregionen Ko-Faktor-abhängig ist. Für eine optimale Interaktion ist sowohl die Gegenwart von Calcium, als auch die von sauren Phospholipiden wie Phosphatidylserin (PS) oder Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) nötig. Für Filamin ist eine Bindung an Phospholipide beschrieben (Tempel et al., 1994). PKC $\alpha$  bindet calciumabhängig an PS und PIP<sub>2</sub>, eine Interaktion, die an der Membranlokalisation der PKC beteiligt ist (Corbalan-Garcia et al., 2003; Murray und Honig, 2002).

Aufschlussreich ist hier, dass die CH-Domänen von Filamin eine Bindung an saure Phospholipide vermitteln (Gimona et al., 2002; Goldmann et al., 1999) aber, wie bereits

erwähnt, nicht an der FLNa-PKC $\alpha$ -Bindung beteiligt sind. Die räumliche Distanz der N-terminal gelegenen PKC $\alpha$ -Bindungsregion zur Lipidbindungsregion ist ein Hinweis darauf, dass die FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion nicht einfach nur durch beiderseitige Lipidbindung vermittelt wird. Saure Phospholipide müssen zwar für eine optimale FLNa PKC $\alpha$  Interaktion anwesend sein, ebenso notwendig ist jedoch auch eine direkte Protein-Protein-Bindung.

Auch C-terminal ist die Interaktion deutlich lipidabhängig. Für Filamin ist C-terminal eine Bindung an saure Phospholipide bis heute nicht publiziert worden. Mittels Saccharose-Lipidvesikel-Pulldown-Versuchen (SLV-Pulldown) (siehe III.3.8.6) gelang es in dieser Arbeit zu zeigen, dass FLNa auch C-terminal an Phospholipide bindet. Die FLNa-Lipidinteraktion wird dabei ausschließlich durch den 24. Ig-Repeat vermittelt (siehe III.3.8.6). Dieses Ergebnis liefert auch für den C-Terminus einen Hinweis dafür, dass die FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion durch Lipidvesikel vermittelt wird, denn PKC $\alpha$  bindet nicht nur an den 24. Ig-Repeat, sondern auch an die hinge2-Region. Also ist auch C-terminal vermutlich eine direkte Protein-Protein-Bindung - neben der Anwesenheit von Lipiden - für eine optimale FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion nötig.

Die Calciumabhängigkeit der FLNa-PKC $\alpha$ -Bindung ist eventuell darin begründet, dass PKC $\alpha$  PS oder PIP<sub>2</sub> nur calciumabhängig binden kann. Für Filamin ist eine direkte Interaktion mit Calcium bis heute nicht beschrieben. Ob die PKC $\alpha$ -Calciumbindung direkt Einfluss auf die Protein-Protein Interaktion zwischen FLNa und PKC $\alpha$  nimmt, kann aus den Ergebnissen nicht mit Sicherheit geschlossen werden. Die Calciumbindung des C2-Motivs der PKC $\alpha$  induziert eine Konformationsänderung innerhalb der regulatorischen Untereinheit der PKC (Cho, 2001). Von dieser Konformationsänderung ist bekannt, dass sie die Bindung der PKC an verschiedene Liganden beeinflusst (Banci et al., 2002). Auf der PKC $\alpha$ -Seite ist es die regulatorische Untereinheit, die die FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion vermittelt (siehe III.3.5), ein Umstand, der eine Beeinflussung der direkten Protein-Protein-Bindung zwischen FLNa und PKC $\alpha$  möglich erscheinen lässt. Calcium alleine hatte allerdings bei den angewendeten Overlay-Versuchen keinen messbaren Einfluss auf die FLNa-PKC $\alpha$ -Bindung (siehe III.3.5). Dies deutet darauf hin, dass Calcium alleine höchstens eine sehr schwache FLNa-PKC $\alpha$ -Bindung vermittelt. Der Umstand, dass auch Phospholipid alleine für eine messbare Interaktion der beiden Proteine nicht ausreicht, deutet darauf, dass ohne die calciumvermittelte Phospholipidbindung von PKC $\alpha$  die Interaktion nicht stattfinden kann.

Insgesamt demonstriert die Ko-Faktorabhängigkeit der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion, dass beide Proteine an der Membran interagieren und dass ihre Interaktion von lokalen Calciumfluktuationen beeinflusst werden könnte.

### **5 FLNa wird durch PKC $\alpha$ in vivo phosphoryliert und erfüllt die Kriterien eines STICK-Interaktionspartners**

Filamin kann in vitro durch PKC $\alpha$  phosphoryliert werden (Kawamoto und Hidaka, 1984). Ob diese Phosphorylierung auch in vivo stattfindet, konnte bis heute allerdings nicht überzeugend demonstriert werden. Lediglich eine erhöhte FLN-Phosphorylierungsrate nach TPA-Stimulation in Ratten-Fibroblasten ist von Ohta und Hartwig im Rahmen einer Untersuchung der Filamin-RSK2-Interaktion gezeigt worden (Ohta und Hartwig, 1996). Dadurch dass eine TPA-Stimulation nicht nur PKCs, sondern auch weitere Proteine mit C1-Motiven beeinflusst, ist diese Behandlung als Beweis einer PKC-Phosphorylierung alleine nicht überzeugend (Kazanietz, 2000; Wilkinson und Hallam, 1994). Die hier durchgeführten Untersuchungen zur In-vivo-Phosphorylierung demonstrieren aber, dass eine durch TPA stimulierte, erhöhte Filamin-Phosphorylierungsrate in HeLa-Zellen, durch die gleichzeitige Gabe von BIM inhibiert werden kann (siehe III.3.8.1). BIM ist ein Inhibitor konventioneller PKCs. BIM inhibiert zwar auch die ATP-Bindung anderer Kinasen, in niedrigen Konzentrationen ist die inhibitorische Wirkung von BIM allerdings cPKC-spezifisch (Davies et al., 2000; Martiny-Baron et al., 1993). Durch die Verwendung sehr niedriger BIM-Konzentrationen und durch die kombinierte Anwendung von TPA-Stimulation und BIM-Inhibition konnte eine PKC-Abhängigkeit der Filamin-Phosphorylierung überzeugend nachgewiesen werden.

Neben der Untersuchung von endogenem Filamin, wurde in der vorliegenden Arbeit die In-vivo-Phosphorylierung auch mit Hilfe C-terminaler FLNa-Fragmente untersucht. Dabei konnte auch für den C-Terminus von FLNa eine PKC-Abhängigkeit der In-vivo-Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Die bisher beschriebenen Eigenschaften der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion weisen Filamin als ein weiteres Mitglied der STICKs aus. STICKS (substrates that interact with C-kinase) sind nach der Definition von Jaken und Parker (Jaken und Parker, 2000) Proteine, die vier Kriterien erfüllen (siehe I.2.2): (1) Sie werden, wie der Name andeutet, durch PKC phosphoryliert. Dies konnte für Filamin in vivo gezeigt werden (siehe III.3.8.1). (2) Ihre Interaktion mit PKC ist Phospholipid-abhängig. Filamin erfüllt diese Bedingung ebenfalls (siehe III.3.4). (3) Es

handelt sich hauptsächlich um Proteine, die an der Schnittstelle zwischen Membranen und zytoskelettären Strukturen zu finden sind. Dies ist für Filamin beschrieben (Stossel et al., 2001). (4) STICKs binden immer an die regulatorische Untereinheit von PKC, was im Fall der Filamin-PKC $\alpha$ -Interaktion deutlich gezeigt werden konnte (siehe III.3.7). Untersucht wurde die Bindungsstärke der PKC $\alpha$ -regulatorischen-Untereinheit, der Kinaseuntereinheit und der V3-Region (siehe Abb.III.12). Von den drei genannten Bereichen ist bekannt, dass sie PKC-Liganden-Interaktionen vermitteln. Die Kinaseuntereinheit der PKC $\alpha$  bindet z.B. an Syndecan-4 (Woods und Couchman, 1998). Die regulatorische Untereinheit verschiedener PKC-Isotypen bindet an STICKs und RACKs (siehe I.2.2) und diverse weitere Proteine (Jaken und Parker, 2000). Die V3-Region vermittelt z.B. die Interaktion mit  $\beta_1$ -Integrin (Parsons et al., 2002). Weder die Kinaseuntereinheit, noch die V3-Region der PKC $\alpha$  hatte einen substanziellen Einfluss auf die FLNa-PKC $\alpha$ -Bindung.

Die Funktion von STICKs wird so verstanden, dass sie PKC-Isoformen in der Zelle lokalisieren. Die Phosphorylierung der STICKs durch PKCs kann die Bindung zwischen dem STICK und PKC selbst modulieren oder aber auch die Bindung des STICK an weitere Protein-Liganden beeinflussen.

## **6 Die FLNa-Phosphorylierung durch PKC $\alpha$ hat keinen Einfluss auf die Dimerisierung oder die Lipidbindung des FLNa-C-Terminus**

C-terminal interagiert PKC $\alpha$  mit dem 24. Ig-Repeat und der hinge2-Region von FLNa (siehe III.3.6) und damit direkt mit einer Region, die von zentraler Bedeutung für verschiedene FLN-Funktionen ist. Der 24. Ig-Repeat vermittelt die FLN-Dimerisierung (Li et al., 1999) und auch die Bindung von Filamin an Phospholipide (siehe III.3.8.6). In der hinge2-Region befindet sich eine Schnittstelle für die Protease Calpain (Gorlin et al., 1990). Ferner sind sowohl für die hinge2-Region als auch für den 24. Ig-Repeat diverse FLN-Liganden beschrieben (Stossel et al., 2001). Es stellte sich die Frage, ob die PKC $\alpha$ -Phosphorylierung irgendeine dieser Funktionen beeinflusst.

Der Einfluss der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung auf die FLN-Spaltung durch Calpain ist nicht untersucht worden. Eine direkte Beeinflussung durch PKC $\alpha$ -Phosphorylierung scheint jedoch nicht sehr wahrscheinlich, da es keine Sequenzmotive für eine PKC $\alpha$ -Phosphorylierung in der Nähe der Calpainschnittstelle gibt.

Die Dimerisierung ist bisher noch nicht im Zusammenhang mit Phosphorylierung untersucht worden. Die Phosphorylierung durch PKC $\alpha$  scheint aber keinen Einfluss auf die Filamin-Dimerisierung zu haben (siehe III.3.8.5).

Ein Einfluss der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung auf die Lipidbindung konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (siehe III.3.8.6).

Die Untersuchung des PKC $\alpha$ -Einflusses auf die Dimerisierung und auf die Lipidbindung wurden jeweils mit in vitro-phosphorylierten FLNa-Fragmenten durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen sollte auch bei einer niedrigen Phosphorylierungseffizienz ein Effekt nachweisbar sein, da mittels Vergleich der Coomassie-Blau-Färbung und der Autoradiographie der Gele das Verhalten des gesamten Filamins vom Verhalten des phosphorylierten unterschieden werden kann. Bei der Untersuchung des PKC $\alpha$ -Einflusses auf die Lipidbindung lag ein Problem darin, dass PKC durch PS-Micellen aktiviert werden muss, der SLV-Pulldown aber durch PS-Micellen gestört wird. Der experimentelle Ansatz zur Lösung dieses Problems, wie unter II.2.2.12 beschrieben, hatte die Konsequenz, dass nur mit geschätzten Proteinkonzentrationen gearbeitet werden konnte. Es ist nicht ganz auszuschließen, dass dies die Ergebnisse des SLV-Pulldowns beeinflusst. Es wäre also interessant, die Untersuchungen zur Lipidbindung des FLNa-C-Terminus mit mutierten Fragmenten zu wiederholen, Fragmente, bei denen die PKC $\alpha$ -Phosphorylierung durch einen Aminosäureaustausch von Serin/Threonin nach Glutamat oder Aspartat nachgeahmt wird. Die FLNa-Phosphorylierungsstellen für PKC $\alpha$  ließen sich allerdings bisher noch nicht ermitteln. Die Phosphorylierung verschiedener C-terminaler Fragmente gab bezüglich der Lokalisation der Phosphorylierungsstellen keinen Aufschluss (siehe III.3.8.3).

## **7 Überlegungen zur Bedeutung der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion**

Die physiologische Bedeutung der meisten PKC-STICK-Interaktionen konnte bisher noch nicht geklärt werden. In den Fällen, wo aber ein detaillierteres Verständnis der Interaktion von Proteinen vorhanden ist, wie bei Adducin (Matsuoka et al., 2000), Ezrin (Ng et al., 2001) oder MARCKs (Aderem, 1992), wird immer das Bindungsverhalten der STICKs zu Proteinliganden oder zu Phospholipiden beeinflusst.

Ein Einfluss der PKC $\alpha$ -Phosphorylierung auf die Lipidbindung des FLNa-C-Terminus konnte allerdings nicht festgestellt werden (siehe III.3.8.6). Da auch andere Funktionen, wie die Dimerisierung von FLNa durch die PKC $\alpha$ -Phosphorylierung nicht beeinflusst werden (siehe III.3.8.5), ist es denkbar, dass die Bedeutung der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion darin besteht, dass

die Bindungseigenschaften von FLNa gegenüber weiteren Protein-Liganden moduliert werden. Der STICK-Definition von Jaken und Parker (Jaken und Parker, 2000) entsprechend, könnte PKC $\alpha$  durch die Interaktion mit FLNa zusätzlich in die Nähe weiterer Substratproteine gebracht werden.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse von Glogauer et al (Glogauer et al., 1998). Nutzt man Collagen-beschichtete, magnetische Kügelchen, um auf das Aktin-Zytoskelett Integrin-vermittelt mechanischen Stress auszuüben, so führt dies zu einer Verstärkung von Zell-Matrix-Kontakten (Mechanoprotektion). Der Effekt ist Calcium-abhängig und führt sowohl zu einer verstärkten Ausbildung von Filamin- $\beta$ 1-Integrin-Komplexen, als auch zu einer erhöhten Filamin-Phosphorylierung. Eine Vorbehandlung der Zellen mit einem spezifischen PKC-Inhibitor verhindert diesen Effekt.

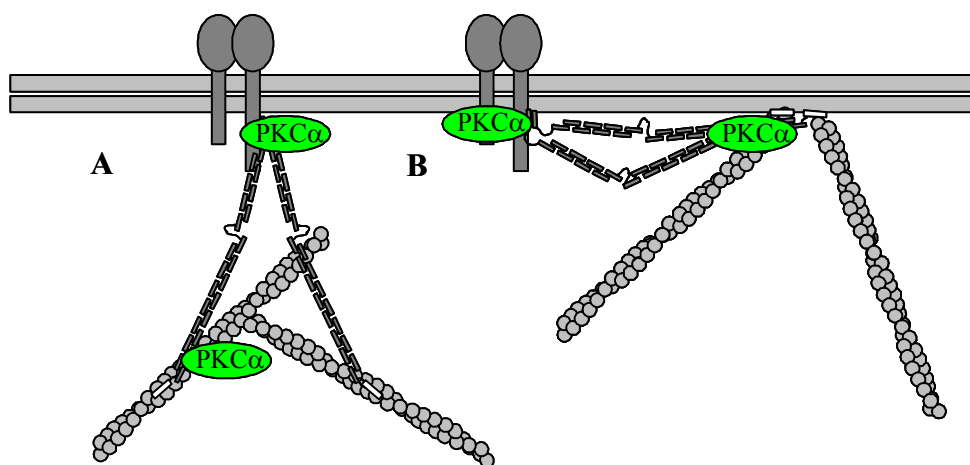
Eine mögliche Funktion der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion könnte somit in der Mechanoprotektion von Zellen bestehen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass von den beiden ubiquitär exprimierten Filamin-Isoformen FLNa und FLNb in erster Linie FLNa an der Mechanoprotektion beteiligt ist. FLNa-defiziente Zellen, die FLNb exprimieren, reagieren auf mechanischen Stress mit einer über 90%igen Steigerung der Apoptoserate. Eine Kontrollzelllinie, in die FLNa stabil transfiziert wurde, zeigt nur noch eine etwa 45%ige Steigerung der Apoptoserate (Glogauer et al., 1998). Dass der C-terminale Bereich von FLNb als einzige Filamin-Isoform in vitro nicht durch PKC $\alpha$  phosphoryliert wird (siehe III.3.8.4), korrespondiert mit dem Befund, dass FLNa, aber nicht FLNb, für die Mechanoprotektion gebraucht wird.

Es deutet also vieles daraufhin, dass nach mechanischem Stress in verschiedenen Zellen Filamin mit PKC $\alpha$  Calcium- und Phospholipid-abhängig interagiert und dass die isotypenspezifische Phosphorylierung von FLNa von kritischer Wichtigkeit für die Mechanoprotektion der Zellen sein könnte. Möglicherweise verstärkt die FLNa-Phosphorylierung dabei die Bindung von Filamin an  $\beta$ 1-Integrin. FLNa könnte dann im Verlauf der Mechanoprotektion zusätzlich als Gerüstprotein dienen und PKC $\alpha$  in die Nähe weiterer Substratproteine bringen.

Im Kontext der Mechanoprotektion wurden bisher zwei mögliche Effekte der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion diskutiert: eine Verstärkung der  $\beta$ 1-Integrin-Bindung an Filamin, so wie eine Beteiligung an der Signaltransduktion. Für eine Modulation der Integrinbindung ist nur eine PKC $\alpha$ -Interaktion mit dem C-terminalen FLNa-Bindungsbereich nötig. Auch im Zusammenhang der Signaltransduktion ist eine Beteiligung der PKC $\alpha$ -Interaktion mit dem FLNa-C-Terminus wahrscheinlich, da dies die Region ist, für die die meisten Interaktionen

beschrieben sind (Stossel et al., 2001). Der Umstand, dass es aber zwei FLNa-Regionen gibt, mit denen PKC $\alpha$  interagiert, ist in der Diskussion der möglichen Bedeutung der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion für die Mechanoprotektion noch nicht berücksichtigt worden. Es wäre denkbar, dass der N-terminal gelegene PKC $\alpha$ -Interaktionsbereich für die Mechanoprotektion nicht benötigt wird und somit auf weitere Funktionen der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion deutet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die PKC $\alpha$ -Signaltransduktion im Rahmen der Mechanoprotektion komplexer ist, als das bisher angenommen wird.

Die Modellvorstellungen zur Aktinorganisation an der Membran durch Filamin sind widersprüchlich. Eine verbreitete Vorstellung ist, dass Filamin über seinen C-terminalen Bereich an membranständige Rezeptoren bindet und gleichzeitig mit seinen CH-Untereinheit F-Aktin vernetzt und an die Plasmamembran koppelt (Abb.IV.3.A) (Stossel et al., 2001). Diese Vorstellung berücksichtigt allerdings nicht, dass die Filamin-CH-Untereinheiten auch an die Membran binden (Tempel et al., 1994). Ferner würden einer Interaktion von PKC $\alpha$  mit dem N-terminalen Filaminbereich (Abb.IV.3.A), in der so dargestellten Organisation, Phospholipide als Ko-Faktoren fehlen. In der von Wolfgang Goldmann postulierten Vorstellung einer Integrin-Filamin-F-Aktin-Organisation (Abb.IV.3.B) (Goldmann, 2001) könnte PKC $\alpha$  mit beiden Filamin-Interaktionsbereichen phospholipidabhängig interagieren. Allerdings ist dieses Modell nicht im Einklang mit dem Befund, dass saure Phospholipide die Aktinbindung von Filamin inhibieren können (Furuhashi et al., 1992); also eine gleichzeitige Bindung der Filamin-CH-Domänen an die Membran und an F-Aktin nicht wahrscheinlich erscheint.



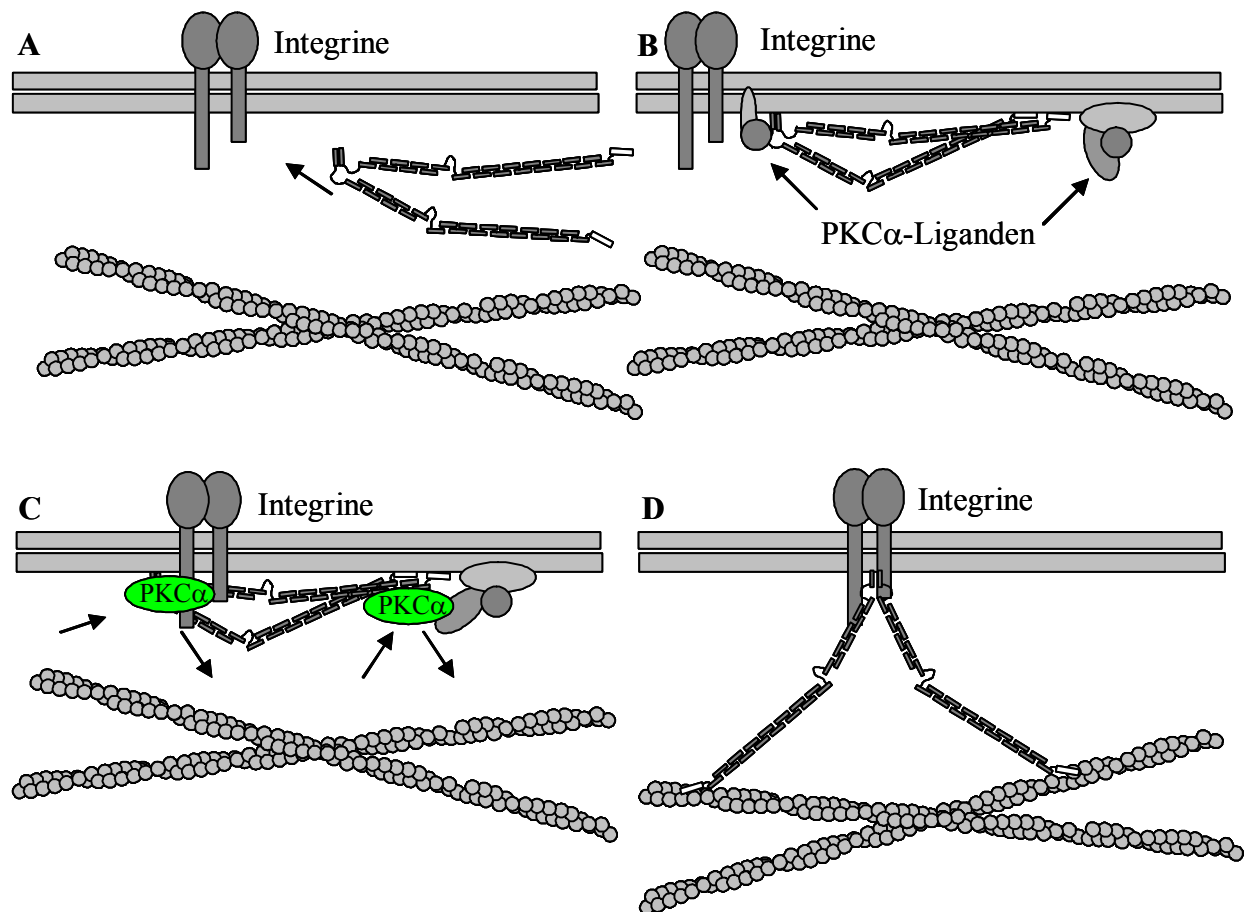
**Abb.IV.3 Modellvorstellungen der Integrin-Filamin-F-Aktin-Organisation.** (A) Eine verbreitete Modellvorstellung, wie Filamin über die Interaktion mit membranständigen Rezeptoren (z.B. Integrine) an der Organisation von F-Aktin direkt an der Plasmamembran beteiligt sein kann (Stossel et al., 2001). Dieses Modell berücksichtigt nicht den Umstand, dass die CH-Domänen außer der F-Aktinbindung auch die Bindung an die Membran vermitteln. (B) Ein weiteres Modell einer Integrin-Filamin-F-Aktin-Organisation berücksichtigt die Membranassoziation der CH-Domänen, allerdings



nicht den Umstand, dass F-Aktin und Lipide wahrscheinlich nicht gleichzeitig an die CH-Domänen binden können.

Eine mögliche Deutung der Widersprüche ist, dass FLNa nicht direkt mit dem C-terminalen Bereich an die Integrine und mit dem N-Terminus an das Aktin-Zytoskelett rekrutiert wird. Der Umstand, dass die CH-Domänen in vitro an die Membran binden (Tempel et al., 1994), deutet darauf hin, dass Filamin auch in einer membranassoziierten Form vorkommen könnte. Filamin könnte dabei sowohl mit dem N-Terminus, als auch mit dem C-Terminus an die Membran binden. Eine Wechselwirkung zwischen Filamin und PKC $\alpha$  könnte nun dazu führen, dass Filamin C-terminal an Integrine bindet. Am N-Terminus könnte PKC $\alpha$  - vermutlich mit Hilfe weiterer membranassoziiierter Proteine – die Loslösung der CH-Domänen von der Membran bewirken. Die frei werdenden CH-Domänen könnten dann an F-Aktin binden, was zu einer Stabilisierung des kortikalen Aktinnetzwerks führen würde.

Der Vorteil einer solchen Membranassoziation von Filamin, ohne gleichzeitige Aktin-Bindung, wäre, dass Filamin zwei Funktionen unabhängig voneinander ausüben könnte. Filamin würde an die Membran binden und könnte dort, ohne F-Aktin zu vernetzen, als Gerüstprotein für verschiedene Proteine der Signaltransduktion dienen. Geraten Zellen jedoch unter mechanischen Stress, könnten die membranassoziierten Filamin-Dimere schnell zusätzliche Integrin-Filamin-F-Aktin-Komplexe zur Stabilisierung der Zellen ausbilden (Abb. IV.4)



**Abb.IV.4 Theoretische Rekrutierung Filamins an die Membran und die zusätzliche Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten zur Mechanoprotektion von Zellen.** (A) Filamin könnte an die Membran rekrutiert werden und dort (B) mit verschiedenen Proteinliganden assoziieren und mittels der CH-Domänen und dem C-Terminus an die Membranphospholipide binden. Bei mechanischem Stress benötigt die Zelle zusätzliche Stabilität. (C) Unter Mitwirkung von PKC $\alpha$  und weiterer Proteine der Signaltransduktion könnten nun (D) stabile Bindungen zu Integrinen und zum Aktin-Zytoskelett ausgebildet werden.

## **8 Ausblick**

Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der FLNa-PKC $\alpha$ -Interaktion liefert ein weiteres Beispiel für die Vielfalt der Wechselwirkungen über welche PKC $\alpha$  an der Regulation der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist.

Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion nicht unmittelbar FLN-Funktionen wie die Dimerisierung oder Lipidbindung reguliert, sondern vermutlich die Bindungseigenschaften von FLN verändert und an der spezifischen Lokalisation von PKC $\alpha$  beteiligt ist. Die Untersuchungen in dieser Arbeit sind stets mit in vitro phosphorylierten Proteinen vorgenommen worden. Zur weiteren Untersuchung des Phosphorylierungseinflusses könnten Versuche mit FLN-Pseudomutanten, also Mutanten in denen durch Mutagenese eine PKC $\alpha$  Phosphorylierung imitiert wird, durchgeführt werden. Mittels solcher Arbeiten könnten zum einen die bereits erzielten Ergebnisse bestätigt werden, zum anderen können die Probleme des Arbeitens mit in vitro phosphoryliertem Protein umgangen werden. Für die PKC $\alpha$ -Phosphorylierung notwendige Ko-Faktoren müssten nicht entfernt werden und die zumeist geringe Filamin-Phosphorylierungsrate müsste nicht berücksichtigt werden. Voraussetzung für die Generation von Pseudophosphorylierungsmutanten ist jedoch zunächst die Identifikation der Phosphorylierungsstelle(n) des Filamins. Neben der Verifizierung der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse bieten Filamin-Phosphorylierungsmutanten die Möglichkeit den Einfluss der Phosphorylierung auf Wechselwirkungen mit Proteinliganden zu untersuchen. Tatsächlich konnte für viele PKC-STICK-Interaktionen ein modulierender Effekt der Phosphorylierung gezeigt werden (Jaken und Parker, 2000)

.Microinjektionsversuche mit rekombinantem Filamin und rekombinantem pseudophosphoryliertem Filamin könnten eventuell die Frage klären, ob die PKC $\alpha$ -vermittelte Filaminphosphorylierung die Lokalisation von Filamin und die Organisation des kortikalen Aktinnetzwerks ändert.

## Literaturverzeichnis

- Aderem, A. (1992) The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell*, **71**, 713-716.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Banci, L., Cavallaro, G., Kheifets, V. and Mochly-Rosen, D. (2002) Molecular dynamics characterization of the C2 domain of protein kinase C $\beta$ . *J Biol Chem*, **277**, 12988-12997.
- Barkalow, K.L., Italiano, J.E., Jr., Chou, D.E., Matsuoka, Y., Bennett, V. and Hartwig, J.H. (2003) Alpha-adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation. *J Cell Biol*, **161**, 557-570.
- Bellanger, J.M., Astier, C., Sardet, C., Ohta, Y., Stossel, T.P. and Debant, A. (2000) The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol*, **2**, 888-892.
- Blobe, G.C., Stribling, D.S., Fabbro, D., Stabel, S. and Hannun, Y.A. (1996) Protein kinase C  $\beta$  II specifically binds to and is activated by F-actin. *J Biol Chem*, **271**, 15823-15830.
- Borbiev, T., Verin, A.D., Shi, S., Liu, F. and Garcia, J.G. (2001) Regulation of endothelial cell barrier function by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **280**, L983-990.
- Borner, C., Eppenberger, U., Wyss, R. and Fabbro, D. (1988) Continuous synthesis of two protein-kinase-C-related proteins after down-regulation by phorbol esters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2110-2114.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bresnick, A.R., Warren, V. and Condeelis, J. (1990) Identification of a short sequence essential for actin binding by Dictyostelium ABP-120. *J Biol Chem*, **265**, 9236-9240.
- Brotschi, E.A., Hartwig, J.H. and Stossel, T.P. (1978) The gelation of actin by actin-binding protein. *J Biol Chem*, **253**, 8988-8993.
- Bucka-Lassen, K., Caprani, O. and Hein, J. (1999) Combining many multiple alignments in one improved alignment. *Bioinformatics*, **15**, 122-130.

- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987) From genes to clones: An introduction to gene technology. Weinheim: VCH.
- Chatterjee A, Faust CJ, Molinari-Storey L, Kiochis P, Poustka A, Herman GE. (1994) A 2.3-Mb yeast artificial chromosome contig spanning from Gabra3 to G6pd on the mouse X chromosome. *Genomics*, **21**, 49-57
- Cho, W. (2001) Membrane targeting by C1 and C2 domains. *J Biol Chem*, 276, 32407-32410.
- Clark, E.A. and Brugge, J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, **268**, 233-239.
- Condeelis, J., Salisbury, J. & Fujiwara, K. (1981) A new protein that gels F actin in the cell cortex of Dictyostelium discoideum. *Nature*, **292**, 161-163.
- Condeelis, J. Geosits, J. & Vabey, M. (1982) Isolation of new actin binding protein from Dictyostelium. *Cell Motility*. **2**, 273-285.
- Corbalan-Garcia, S., Garcia-Garcia, J., Rodriguez-Alfaro, J.A. and Gomez-Fernandez, J.C. (2003) A new phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site located in the C2 domain of protein kinase Calpha. *J Biol Chem*, **278**, 4972-4980.
- Cunningham, C.C., Gorlin, J.B., Kwiatkowski, D.J., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Byers, H.R. and Stossel, T.P. (1992) Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science*, **255**, 325-327.
- Davies, P., Shizuta, Y., Olden, K., Gallo, M. and Pastan, I. (1977) Phosphorylation of filamin and other proteins in cultured fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **74**, 300-307.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. and Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, **351**, 95-105.
- Dekker, L.V. and Parker, P.J. (1994) Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci*, **19**, 73-77.
- Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A. and Messing, R.O. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **279**, L429-438.
- Dong, L., Chapline, C., Mousseau, B., Fowler, L., Ramsay, K., Stevens, J.L. and Jaken, S. (1995) 35H, a sequence isolated as a protein kinase C binding protein, is a novel member of the adducin family. *J Biol Chem*, **270**, 25534-25540.

- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629-635.
- Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddell, C.J. and Beach, D. (1994) Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1502-1503.
- Feramisco, J.R. and Burridge, K. (1980) A rapid purification of alpha-actinin, filamin, and a 130,000-dalton protein from smooth muscle. *J Biol Chem*, **255**, 1194-1199.
- Fisher, P.R., Noegel, A.A., Fechheimer, M., Rivero, F., Prassler, J. and Gerisch, G. (1997) Photosensory and thermosensory responses in Dictyostelium slugs are specifically impaired by absence of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120). *Curr Biol*, **7**, 889-892.
- Fox, J.W., Lamperti, E.D., Eksioglu, Y.Z., Hong, S.E., Feng, Y., Graham, D.A., Scheffer, I.E., Dobyns, W.B., Hirsch, B.A., Radtke, R.A., Berkovic, S.F., Huttenlocher, P.R. and Walsh, C.A. (1998) Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron*, **21**, 1315-1325.
- Fucini, P., Renner, C., Herberhold, C., Noegel, A.A. and Holak, T.A. (1997) The repeating segments of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120) have an immunoglobulin-like fold. *Nat Struct Biol*, **4**, 223-230.
- Furuhashi, K., Inagaki, M., Hatano, S., Fukami, K. and Takenawa, T. (1992) Inositol phospholipid-induced suppression of F-actin-gelating activity of smooth muscle filamin. *Biochem Biophys Res Commun*, **184**, 1261-1265.
- Galbiati, F., Razani, B. and Lisanti, M.P. (2001) Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell*, **106**, 403-411.
- Gariboldi, M., Maestrini, E., Canzian, F., Vanenti, G., De Gregorio, L., Rivella, S., Chatterjee, A., Herman, G.E., Arcidiacono, N., Antonacci, R., et al. (1994) Comparative mapping of the actin-binding protein 280 genes in human and mouse. *Genomics*, **21**, 428-430.
- Gill, G.N. (1995) The enigma of LIM domains. *Structure*, **3**, 1285-1289.
- Gimona, M. and Mital, R. (1998). The single CH domain of calponin is neither sufficient nor necessary for F-actin binding. *J. Cell Sci.* **111**, 1813-1821.
- Gimona, M., Djinoovic-Carugo, K., Kranewitter, W.J. and Winder, S.J. (2002) Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett*, **513**, 98-106.

- Glogauer, M., Arora, P., Chou, D., Janmey, P.A., Downey, G.P. and McCulloch, C.A. (1998) The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J Biol Chem*, **273**, 1689-1698.
- Goldmann, W.H. (2001) Phosphorylation of filamin (ABP-280) regulates the binding to the lipid membrane, integrin, and actin. *Cell Biol Int*, **25**, 805-808.
- Goldmann, W.H. (2002) p56(lck) Controls phosphorylation of filamin (ABP-280) and regulates focal adhesion kinase (pp125(FAK)). *Cell Biol Int*, **26**, 567-571.
- Goldmann, W.H. and Isenberg, G. (1993) Analysis of filamin and alpha-actinin binding to actin by the stopped flow method. *FEBS Lett*, **336**, 408-410.
- Goldmann, W.H., Teodoridis, J.M., Sharma, C.P., Hu, B. and Isenberg, G. (1999) Fragments from actin binding protein (ABP-280; filamin) insert into reconstituted lipid layers. *Biochem Biophys Res Commun*, **259**, 108-112.
- Goodnight, J.A., Mischak, H., Kolch, W. and Mushinski, J.F. (1995) Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem*, **270**, 9991-10001.
- Gorlin, J.B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T.P., Kwiatkowski, D.J. and Hartwig, J.H. (1990) Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol*, **111**, 1089-1105.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551.
- Hartwig, J.H. and Stossel, T.P. (1975) Isolation and properties of actin, myosin, and a new actinbinding protein in rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem*, **250**, 5696-5705.
- Hartwig, J.H. and Stossel, T.P. (1981) Structure of macrophage actin-binding protein molecules in solution and interacting with actin filaments. *J Mol Biol*, **145**, 563-581.
- Hartwig, J.H., Tyler, J. and Stossel, T.P. (1980) Actin-binding protein promotes the bipolar and perpendicular branching of actin filaments. *J Cell Biol*, **87**, 841-848.
- Heldin, C.H., and Purton, M. (1996) Signal Transduction. London: Chapman & Hall.
- Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, **73**, 237-244.
- Himmel, M., Van Der Ven, P.F., Stocklein, W. and Furst, D.O. (2003) The limits of promiscuity: isoform-specific dimerization of filamins. *Biochemistry*, **42**, 430-439.

- Hinck, L., Nathke, I.S., Papkoff, J. und Nelson, W.J. (1994) Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol*, **125**, 1327-1340.
- Honda, M., Takiguchi, K., Ishikawa, S. and Hotani, H. (1999) Morphogenesis of liposomes encapsulating actin depends on the type of actin-crosslinking. *J Mol Biol*, **287**, 293-300.
- Horowitz, A. and Simons, M. (1998) Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase Calpha. *J Biol Chem*, **273**, 25548-25551.
- Huang, K.P., Nakabayashi, H. and Huang, F.L. (1986) Isozymic forms of rat brain Ca<sup>2+</sup>-activated and phospholipid-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8535-8539.
- Huttelmaier, S., Mayboroda, O., Harbeck, B., Jarchau, T., Jockusch, B.M. and Rudiger, M. (1998) The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol*, **8**, 479-488.
- Hyatt, S.L., Liao, L., Chapline, C. and Jaken, S. (1994) Identification and characterization of alpha-protein kinase C binding proteins in normal and transformed REF52 cells. *Biochemistry*, **33**, 1223-1228.
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. and Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem*, **252**, 7610-7616.
- Ito, T., Suzuki, A. and Stossel, T.P. (1992) Regulation of water flow by actin-binding protein-induced actin gelatin. *Biophys J*, **61**, 1301-1305.
- Jaken, S., Leach, K. and Klauck, T. (1989) Association of type 3 protein kinase C with focal contacts in rat embryo fibroblasts. *J Cell Biol*, **109**, 697-704.
- Jaken, S. and Parker, P.J. (2000) Protein kinase C binding partners. *Bioessays*, **22**, 245-254.
- Jay, D., Garcia, E.J., Lara, J.E., Medina, M.A. and de la Luz Ibarra, M. (2000) Determination of a cAMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the C-terminal region of human endothelial actin-binding protein. *Arch Biochem Biophys*, **377**, 80-84.
- Kainulainen, T., Pender, A., D'Addario, M., Feng, Y., Lekic, P. and McCulloch, C.A. (2002) Cell death and mechanoprotection by filamin a in connective tissues after challenge by applied tensile forces. *J Biol Chem*, **277**, 21998-22009.



- Kawamoto, S. and Hidaka, H. (1984) Ca<sup>2+</sup>-activated, phospholipid-dependent protein kinase catalyzes the phosphorylation of actin-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **118**, 736-742.
- Kazanietz, M.G. (2000) Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol Carcinog*, **28**, 5-11.
- Kazanietz, M.G. (2002) Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol*, **61**, 759-767.
- Keenan, C. and Kelleher, D. (1998) Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal*, **10**, 225-232.
- Keranen, L.M., Dutil, E.M. and Newton, A.C. (1995) Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol*, **5**, 1394-1403.
- Kiley, S.C. and Parker, P.J. (1995) Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J Cell Sci*, **108** ( Pt 3), 1003-1016.
- Kimura, K., Fukata, Y., Matsuoka, Y., Bennett, V., Matsuura, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K. (1998) Regulation of the association of adducin with actin filaments by Rho-associated kinase (Rho-kinase) and myosin phosphatase. *J Biol Chem*, **273**, 5542-5548.
- Koch, C.A., Anderson, D., Moran, M.F., Ellis, C. and Pawson, T. (1991) SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, **252**, 668-674.
- Korenbaum, E. and Revero, F. (2002). Calponin homology domains at a glance. *J. Cell Sci*. **115**, 3543-3545.
- Koteliansky, V.E., Glukhova, M.A., Shirinsky, V.P., Babaev, V.R., Kandalenko, V.F., Rukosuev, V.S. and Smirnov, V.N. (1981) Identification of a filamin-like protein in chicken heart muscle. *FEBS Lett*, **125**, 44-48.
- Kuroda, S., Tokunaga, C., Kiyohara, Y., Higuchi, O., Konishi, H., Mizuno, K., Gill, G.N. and Kikkawa, U. (1996) Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C. *J Biol Chem*, **271**, 31029-31032.
- Kwak, K.B., Chung, S.S., Kim, O.M., Kang, M.S., Ha, D.B. and Chung, C.H. (1993) Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, **1175**, 243-249.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Langanger, G., de Mey, J., Moeremans, M., Daneels, G., de Brabander, M. and Small, J.V. (1984) Ultrastructural localization of alpha-actinin and filamin in cultured cells with the immunogold staining (IGS) method. *J Cell Biol*, **99**, 1324-1334.
- Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D. and Caroni, P. (2000) GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol*, **149**, 1455-1472.
- Lebart, M.C., Mejean, C., Casanova, D., Audemard, E., Derancourt, J., Roustan, C. and Benyamin, Y. (1994) Characterization of the actin binding site on smooth muscle filamin. *J Biol Chem*, **269**, 4279-4284.
- Lee, J.Y., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (1996) Ceramide inactivates cellular protein kinase Calpha. *J Biol Chem*, **271**, 13169-13174.
- Leinweber, B., Parissenti, A.M., Gallant, C., Gangopadhyay, S.S., Kirwan-Rhude, A., Leavis, P.C. and Morgan, K.G. (2000) Regulation of protein kinase C by the cytoskeletal protein calponin. *J Biol Chem*, **275**, 40329-40336.
- Li, M.G., Serr, M., Edwards, K., Ludmann, S., Yamamoto, D., Tilney, L.G., Field, C.M. and Hays, T.S. (1999) Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during Drosophila oogenesis. *J Cell Biol*, **146**, 1061-1074.
- Maestrini, E., Rivella, S., Tribioli, C., Purtilo, D., Rocchi, M., Archidiacono, N., Toniolo, D. (1990) Probes for CpG islands on the distal long arm of the human X chromosome are clustered in Xq24 and Xq28. *Genomics*, **8**, 664-670
- Marti, A., Luo, Z., Cunningham, C., Ohta, Y., Hartwig, J., Stossel, T.P., Kyriakis, J.M. and Avruch, J. (1997) Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. *J Biol Chem*, **272**, 2620-2628.
- Martiny-Baron, G., Kazanietz, M.G., Mischak, H., Blumberg, P.M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D. and Schachtele, C. (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem*, **268**, 9194-9197.
- Matsudaira, P. (1994) Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin Cell Biol*, **5**, 165-174.

- Matsuoka, Y., Hughes, C.A. and Bennett, V. (1996) Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C. *J Biol Chem*, **271**, 25157-25166.
- Matsuoka, Y., Li, X. and Bennett, V. (1998) Adducin is an in vivo substrate for protein kinase C: phosphorylation in the MARCKS-related domain inhibits activity in promoting spectrin-actin complexes and occurs in many cells, including dendritic spines of neurons. *J Cell Biol*, **142**, 485-497.
- Matsuoka, Y., Li, X. and Bennett, V. (2000) Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 884-895.
- Mellor, H. and Parker, P.J. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, **332** ( Pt 2), 281-292.
- Mochly-Rosen, D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*, **268**, 247-251.
- Morrice, N.A., Fecondo, J. and Wettenhall, R.E. (1994) Differential effects of fatty acid and phospholipid activators on the catalytic activities of a structurally novel protein kinase from rat liver. *FEBS Lett*, **351**, 171-175.
- Murakami, M., Horowitz, A., Tang, S., Ware, J.A. and Simons, M. (2002) Protein kinase C (PKC) delta regulates PKCalpha activity in a Syndecan-4-dependent manner. *J Biol Chem*, **277**, 20367-20371.
- Murray, D. and Honig, B. (2002) Electrostatic control of the membrane targeting of C2 domains. *Mol Cell*, **9**, 145-154.
- Newton, A.C. (1996) Protein kinase C: ports of anchor in the cell. *Curr Biol*, **6**, 806-809.
- Newton, A.C. (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 161-167.
- Ng, T., Parsons, M., Hughes, W.E., Monypenny, J., Zicha, D., Gautreau, A., Arpin, M., Gschmeissner, S., Verveer, P.J., Bastiaens, P.I. and Parker, P.J. (2001) Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *Embo J*, **20**, 2723-2741.
- Ng, T., Shima, D., Squire, A., Bastiaens, P.I., Gschmeissner, S., Humphries, M.J. and Parker, P.J. (1999) PKCalpha regulates beta1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *Embo J*, **18**, 3909-3923.
- Nikki, M., Merilainen, J. and Lehto, V.P. (2002) FAP52 regulates actin organization via binding to filamin. *J Biol Chem*, **277**, 11432-11440.

- Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, **308**, 693-698.
- Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, **233**, 305-312.
- Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J*, **9**, 484-496.
- Oh, E.S., Woods, A. and Couchman, J.R. (1997) Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem*, **272**, 8133-8136.
- Ohno, S., Konno, Y., Akita, Y., Yano, A. and Suzuki, K. (1990) A point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase C alpha abolishes the kinase activity and renders it down-regulation-insensitive. A molecular link between autophosphorylation and down-regulation. *J Biol Chem*, **265**, 6296-6300.
- Ohta, Y. and Hartwig, J.H. (1995) Actin filament cross-linking by chicken gizzard filamin is regulated by phosphorylation in vitro. *Biochemistry*, **34**, 6745-6754.
- Ohta, Y. and Hartwig, J.H. (1996) Phosphorylation of actin-binding protein 280 by growth factors is mediated by p90 ribosomal protein S6 kinase. *J Biol Chem*, **271**, 11858-11864.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H. and Stossel, T.P. (1999) The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2122-2128.
- Onji, T., Takagi, M. and Shibata, N. (1987) Calpain abolishes the effect of filamin on the actomyosin system in platelets. *Biochim Biophys Acta*, **912**, 283-286.
- Palmer, R.H., Dekker, L.V., Woscholski, R., Le Good, J.A., Gigg, R. and Parker, P.J. (1995) Activation of PRK1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. A comparison with protein kinase C isotypes. *J Biol Chem*, **270**, 22412-22416.
- Pappa, H., Dekker, L.V., Parker, P.J. and McDonald, N.Q. (1998) Preliminary X-ray analysis of a C2-like domain from protein kinase C-delta. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54 ( Pt 4)**, 693-696.
- Parekh, D.B., Katso, R.M., Leslie, N.R., Downes, C.P., Procyk, K.J., Waterfield, M.D. and Parker, P.J. (2000a) Beta1-integrin and PTEN control the phosphorylation of protein kinase C. *Biochem J*, **352 Pt 2**, 425-433.
- Parekh, D.B., Ziegler, W. and Parker, P.J. (2000b) Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *Embo J*, **19**, 496-503.

- Parsons, M., Keppler, M.D., Kline, A., Messent, A., Humphries, M.J., Gilchrist, R., Hart, I.R., Quittau-Prevostel, C., Hughes, W.E., Parker, P.J. and Ng, T. (2002) Site-directed perturbation of protein kinase C- integrin interaction blocks carcinoma cell chemotaxis. *Mol Cell Biol*, **22**, 5897-5911.
- Pawson, T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature*, **373**, 573-580.
- Pears, C., Stabel, S., Cazaubon, S. and Parker, P.J. (1992) Studies on the phosphorylation of protein kinase C-alpha. *Biochem J*, **283** ( Pt 2), 515-518.
- Pietromonaco, S.F., Simons, P.C., Altman, A. and Elias, L. (1998) Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem*, **273**, 7594-7603.
- Pollard, T.D. and Borisy, G.G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, **112**, 453-465.
- Prekeris, R., Hernandez, R.M., Mayhew, M.W., White, M.K. and Terrian, D.M. (1998) Molecular analysis of the interactions between protein kinase C-epsilon and filamentous actin. *J Biol Chem*, **273**, 26790-26798.
- Prekeris, R., Mayhew, M.W., Cooper, J.B. and Terrian, D.M. (1996) Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J Cell Biol*, **132**, 77-90.
- Rudiger, M., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. (1997) Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques*, **23**, 96-97.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sasaki, A., Masuda, Y., Ohta, Y., Ikeda, K. and Watanabe, K. (2001) Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, **276**, 17871-17877.
- Serebriiskii, I., Estojak, J., Berman, M. and Golemis, E.A. (2000) Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *Biotechniques*, **28**, 328-330, 332-326.
- Shizuta, Y., Shizuta, H., Gallo, M., Davies, P. and Pastan, I. (1976) Purification and properties of filamin, and actin binding protein from chicken gizzard. *J Biol Chem*, **251**, 6562-6567.

- Sokol, N.S. and Cooley, L. (1999) Drosophila filamin encoded by the cheerio locus is a component of ovarian ring canals. *Curr Biol*, **9**, 1221-1230.
- Stahlhut, M. and van Deurs, B. (2000) Identification of Filamin as a Novel Ligand for Caveolin-1: Evidence for the Organization of Caveolin-1-associated Membrane Domains by the Actin Cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, **11**, 325-37.
- Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, A., Schleicher, M. and Shapiro, S.S. (2001) Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 138-145.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.
- Tempel, M., Goldmann, W.H., Dietrich, C., Niggli, V., Weber, T., Sackmann, E. and Isenberg, G. (1994) Insertion of filamin into lipid membranes examined by calorimetry, the film balance technique, and lipid photolabeling. *Biochemistry*, **33**, 12565-12572.
- Tigges, U., Koch, B., Wissing, J., Jockusch, B.M., Ziegler, W.H. (2003) The F-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin A is a ligand and in vivo substrate for protein kinase C alpha. *J Biol Chem*, **278**, 23561-23569.
- Tsutakawa, S.E., Medzihradszky, K.F., Flint, A.J., Burlingame, A.L. and Koshland, D.E., Jr. (1995) Determination of in vivo phosphorylation sites in protein kinase C. *J Biol Chem*, **270**, 26807-26812.
- Turner, C.E., Pavalko, F.M. and Burridge, K. (1989) The role of phosphorylation and limited proteolytic cleavage of talin and vinculin in the disruption of focal adhesion integrity. *J Biol Chem*, **264**, 11938-11944.
- Tyler, J.M., Anderson, J.M. and Branton, D. (1980) Structural comparison of several actin-binding macromolecules. *J Cell Biol*, **85**, 489-495.
- Vadlamudi, R.K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T.P. and Kumar, R. (2002) Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol*, **4**, 681-690.
- van der Flier, A., Kuikman, I., Kramer, D., Geerts, D., Kreft, M., Takafuta, T., Shapiro, S.S. and Sonnenberg, A. (2002) Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin [beta] subunits. *J Cell Biol*, **156**, 361-376.

- Villarejo, M.R. and Zabin, I. (1974) Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol*, **120**, 466-474.
- Vincent, S. and Settleman, J. (1997) The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol*, **17**, 2247-2256.
- Wallach, D., Davies, P., Bechtel, P., Willingham, M. and Pastan, I. (1978a) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the actin-binding protein filamin. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, **9**, 371-379.
- Wallach, D., Davies, P.J. and Pastan, I. (1978b) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of filamin in mammalian smooth muscle. *J Biol Chem*, **253**, 4739-4745.
- Wang, K., Ash, J.F. and Singer, S.J. (1975) Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 4483-4486.
- Weekes, J., Barry, S.T. and Critchley, D.R. (1996) Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem J*, **314** (Pt 3), 827-832.
- Weihing, R.R. (1988) Actin-binding and dimerization domains of HeLa cell filamin. *Biochemistry*, **27**, 1865-1869.
- Werth, D.K. and Pastan, I. (1984) Vinculin phosphorylation in response to calcium and phorbol esters in intact cells. *J Biol Chem*, **259**, 5264-5270.
- Wiedemann, P., Giehl, K., Almo, S.C., Fedorov, A.A., Girvin, M., Steinberger, P., Rudiger, M., Ortner, M., Sippl, M., Dolecek, C., Kraft, D., Jockusch, B. and Valenta, R. (1996) Molecular and structural analysis of a continuous birch profilin epitope defined by a monoclonal antibody. *J Biol Chem*, **271**, 29915-29921.
- Wilkinson, S.E. and Hallam, T.J. (1994) Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation over-stated? *Trends Pharmacol Sci*, **15**, 53-57.
- Woods, A. and Couchman, J.R. (1992) Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J Cell Sci*, **101** ( Pt 2), 277-290.
- Woods, A. and Couchman, J.R. (1998) Syndecans: synergistic activators of cell adhesion. *Trends Cell Biol*, **8**, 189-192.
- Xie, Z., Xu, W., Davie, E.W. and Chung, D.W. (1998) Molecular cloning of human ABPL, an actin-binding protein homologue. *Biochem Biophys Res Commun*, **251**, 914-919.

- Young, K.H. (1998) Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time. *Biol Reprod*, **58**, 302-311.
- Zamir, E. and Geiger, B. (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, **114**, 3583-3590.
- Zhang, X.A., Bontrager, A.L. and Hemler, M.E. (2001) Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem*, **276**, 25005-25013.
- Zhang, W., Han, S. W., McKeel, D. W., Goate, A., Wu, J. Y. (1998) Interaction of presenilins with the filamin family of actin-binding proteins. *J. Neurosci.* **18**, 914-922.
- Ziegler, W.H., Tigges, U., Zieseniss, A. and Jockusch, B.M. (2002) A lipid-regulated docking site on vinculin for protein kinase C. *J Biol Chem*, **277**, 7396-7404.